

VIRAL (HIV) GROWTH INHIBITION

Patent Number: WO9202228
Publication date: 1992-02-20
Inventor(s): GAIT MICHAEL JOHN (GB); KARN JONATHAN (GB); DINGWALL COLIN (GB); HEAPHY SHAUN (GB)
Applicant(s): MEDICAL RES COUNCIL (GB)
Requested Patent: WO9202228
Application Number: WO1991GB01321 19910802
Priority Number(s): GB19900016973 19900802
IPC Classification: A61K31/70; C12Q1/70; G01N33/52; G01N33/569
EC Classification: C12Q1/68A8, A61K31/70C, C12Q1/70B2B, C07K14/16, C12N15/67
Equivalents: EP0542822 (WO9202228), JP3330595B2, JP6500012T
Cited Documents: EP0386563

Abstract

A synthetic molecule comprises at least one oligonucleotide comprising an RNA binding sequence or sequences corresponding to the site bound by the HIV protein tat and capable of binding to tat within cells. The binding sequence or sequences, by binding tat within cells, can act to cause inhibition of growth of any HIV present in the cells, and so has potential therapeutic use in treatment of patients infected with HIV. The invention also provides an assay for identifying compounds that inhibit tat binding.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-500012

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)1月6日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 N 15/49	ZNA		
A 61 K 31/70	ADY	8314-4C	
		8314-4C	
48/00			
C 12 Q 1/68	Z	7823-4B	
		8931-4B	C 12 N 15/00 A
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願平3-513229
(86) (22)出願日 平成3年(1991)8月2日
(85)翻訳文提出日 平成5年(1993)2月2日
(86)国際出願番号 PCT/GB91/01321
(87)国際公開番号 WO92/02228
(87)国際公開日 平成4年(1992)2月20日
(31)優先権主張番号 9016973.1
(32)優先日 1990年8月2日
(33)優先権主張国 イギリス(GB)
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, SE), JP, US

(71)出願人 メディカル・リサーチ・カウンシル
イギリス、ダブリュ・1・エヌ 4・エ
イ・エル、ロンドン、パーク・クレッセン
ト、20
(72)発明者 カーン、ジョナサン
イギリス、シイ・ビィ・2 5・エイチ・
ジェイ、ケンブス、リトル・シェルフォー
ド、ホークストン・ロード、53
(72)発明者 ゲイト、マイケル・ジョン
イギリス、シイ・ビィ・1 4・ジェイ・
ビィ、ケンブリッジ、フォレスト・ロー
ド、16
(74)代理人 弁理士 深見 久郎 (外3名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウィルス(HIV)増殖抑制

(57)【要約】

合成功子はHIVタンパク質tatによって結合され、細胞内でのtatへの結合が可能な部位に対応する単数または複数のRNA結合配列を含む少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。単数または複数の結合配列は、細胞内でtatを結合することによって、細胞に存在する任意のHIVの増殖の抑制を生じるように作用することが可能であり、それでHIVに感染した患者の治療における潜在的な治療的用途を有する。この発明はまたtat結合を抑制する化合物を識別するための検定を提供する。

特表平6-500012 (2)

請求の範囲

1. H I Vタンパク質tatによって結合される部位に対応する1つまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内においてtatへ結合することが可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む合成分子。
2. H I Vタンパク質tatによって結合される部位に対応する1つまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内においてtatへ結合することが可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む合成分子を含む薬学的組成物。
3. H I Vに感染した患者の治療に使用するための合成分子であって、この分子はH I Vタンパク質tatによって結合される部位に対応する1つまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内においてtatへの結合が可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む合成分子。
4. 細胞内のH I Vの増殖を抑制するための薬剤の製造における、H I Vタンパク質tatによって結合される部位に対応する1つまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内においてtatへの結合が可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む合成分子の使用。
5. 細胞内のH I Vウイルスの増殖を抑制する方法であって、請求項1に従った分子、または請求項3に従った薬学的組成物を細胞へ投与するステップを含む、方法。
6. H I Vに感染した患者の治疗方法であって、請求項

1に従った分子または請求項3に従った薬学的組成物を患者に投与するステップを含む、方法。

7. TAR RNAへのtatプロテインの結合を抑制する化合物を同定するための検定であって、化合物をtatプロテインおよび請求項1に従った分子と反応させることと、その分子へのtatの結合度を測定することとを含む、検定。

8. 合成分子は長さにおいて20個の残基より長くないオリゴヌクレオチドからなる、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

9. オリゴヌクレオチドは、H I V TAR RNAの配列におけるU₂、に対応するウリジン残基を含む3つの不対残基を含むと共に、H I V TAR RNA配列におけるG₂ - G₃ に対応するフランキング塩基対を含む、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

10. RNA結合配列はDNA基底配列に組込まれる、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

11. その、または各オリゴヌクレオチドは、天然に存在するオリゴヌクレオチドであるか、修飾された塩基および／もしくは糖ならびに／または結合を有するオリゴヌクレオチドのような構造的に関連した変形物である、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

12. その、または各オリゴヌクレオチドは1つ、またはそれより多い4-チオ-2'-デオキシチミジン残基の

包含によって修飾される、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

明細書

名称：ウイルス（H I V）増殖抑制

発明の分野

この発明は細胞内のウイルス増殖の抑制の方法およびそれにおける使用のための組成物に関するものである。特定的には、この発明はヒト免疫不全ウイルス（H I V）の増殖抑制に関するものである。

発明の背景

ウイルス複製中のH I Vゲノムの転写は明確な動力学的状態を示す（参考文献53、59、60、79を参照）。H I V遺伝子発現の初期生産物は短く、長さ約1.8ないし2.0 kbのスプライシングされたmRNAを増殖し、これはトランス作用性調節タンパク質tat、rev（およびおそらくnef）をコードする。ウイルスによる感染が進み、tatおよびrevタンパク質のレベルが感染された細胞において上昇するに伴い、mRNA生産はenvやvifおよびvprのような他のH I V遺伝子生産物をコードする単独にスプライシングされた4.3 kb mRNAの系統群の生産へ徐々に移行する。最後に感染過程の末期において生産は全長のスプライシングされていない転写へ切換わり、これはウイルス粒子RNAとしても、gag-polポリプロテインのためのmRNAとしても作用する。

この遺伝子発現制御を達成するために、H I Vウイルス

特表平6-500012 (3)

は細胞性でかつウィルスによりコードされたトランス作用性因子とシス作用性ウィルス調節配列 (cis-acting viral regulatory sequences) との相互作用に依存する (1、3、5.3)。転写の開始はウィルスのLTR (long terminal repeat) における細胞性転写因子のための結合部の存在に大きく依存する (2.8)。対照して、ウィルスによりコードされた調節タンパク質tatおよびrevはHIV メッセンジャーRNA内のコードされたシス作用性配列によってそれらの活性を動かせる。トランス活性化応答領域 (TAR) はtat活性に必要とされ、ウィルスのLTRにおいて残基+1および+79の間に位置決めされる (5、9、10、11、12、13、14、15、27、38)。rev応答エレメント (RRE) はenv遺伝子内において234タクレオチド長配列へ局在されている (47、51、54、65、67、68、77)。類似の調節タンパク質および標的配列がHIV-2およびSIVによって使用される (8、66)。HTLV-1ウィルスrex遺伝子生産物はrevに類似して機能すると思われ、かつrevと機能的に置換してウィルス遺伝子発現を促進し得る (76)。

HIV転写の明瞭な動力学的状態は調整タンパク質tatおよびrevの細胞内レベルを反映すると現在考えられている。まず、宿主転写因子のLTRへの結合はtatを含む初期mRNAの基底レベル転写を誘導する。tatレ

ベルが上昇するに伴い、LTRからの増加された転写はトランス活性化機構によって刺激される。これによってtatレベルはさらに上昇し、revの生産もまた刺激される。ウィルス構造タンパク質の生産は、revレベルがひとたびrev応答エレメント (RRE) 配列を運ぶメッセンジャーRNAの移出を促進するのに十分に高いレベルに達すると始まる。HIV増殖周期は、ウィルスLTRからの転写が溶菌増殖サイクルを開始するのに不十分な量の調節タンパク質しか生産しないためにウィルス増殖発現が活動していない潜伏段階も含むかもしれない。

HIV遺伝子発現の著しいレベルはtatタンパク質の存在においてのみ達成される。まず、tat活性がウィルスLTRにおける配列への宿主転写因子の結合を刺激するか、または転写因子そのものとして作用するかのいずれかによって転写開始速度を増加したことが最も起こり得ると思われた (1、3、5.3)。しかし、いくつかの実験はtat活性がDNA標的配列よりむしろRNA標的配列を必要とすることを強く示唆する。

ウィルスLTRの欠失分析は、tat活性がトランス活性化応答領域 (TAR) と呼ばれる、残基+1と+7.9との間のすべてのmRNA転写物の5'末端において転写の開始部位の下流に位置決めされる調節エレメントを必要とすることを示した (5、10、11、2.7、28)。転写された領域におけるTARの配置は意外なものであった。

それはこの配置がそれがDNAエレメントよりむしろRNAとして機能し得ることを示唆したからである。この考えは、エンハンサエレメントとは異なりTARエレメントがHIVプロモータへの3'に、かつ正しい配向および位置に位置付けられているときのみ機能的であるという観察によって支持された (5、12-15)。さらに、TAR RNA配列は高度に安定したタクレアーゼ抵抗性のヌクレオチド構造を形成し、塩基対合を分断することによってTARシステムを脱安定化する点変異が通常tatによって刺激された転写を終らせる (8.8)。

バークハウト (Burkhardt) ら (16) は、TAR RNA配列がトランス活性化が生じるために核内で転写され、かつ正しく折り畳まれねばならないという脱離力のある証拠を与えた。彼らはTARの上流または下流のいずれかのTAR RNAへアビンループ構造の形成を脱安定化するようにデザインされたアンチセンス配列を導入した。TARの正しい折り畳みおよびトランス活性化はいずれも、この脱安定化配列がTARの5'側に位置付けられたとき遮断されたが、TARの3'側における同一配列の位置付けは正常なトランス活性化を許容した。このことはTARへアビンループ構造が未完成の転写物上で折り畳み、かつ活性になり得ることを強く示唆した。

トランス活性化は上流のプロモータエレメントへのDNA結合タンパク質のtat調節によるものではないと思わ

れる (17)、それはSp1部位の上流で切って軽くされたか (18)、または異種構造のプロモータへ融合された (5、19、20) ウィルスLTRがトランス活性化されるであろうからである。

tat発現細胞において、ハイブリッド形成によって測定されたようなmRNAレベルと、一連の実験によって測定されたような核転写速度とはいすれも7ないし40倍に増加される (8.8、89)。tatがTARを運ぶmRNAの翻訳効率も増加し得るかどうかに関してはかなりの論争があったが、tatによって促進されたmRNA合成の増加はトランス活性化の理由を説明するのに十分であるということが現在は明らかであるように思われる。形質移入された細胞におけるCAT mRNAおよびCATタンパク質レベルの双方の的確な測定は、タンパク質が広範囲にわたってmRNAに並行して蓄積したことを見出す。CAT mRNAの極めて低いレベルでは、メッセージの高いレベルにおけるよりも転写効率が低い。しかしRNA使用におけるこの増加はtat特異的ではない、それはアデノウイルスE1Aタンパク質による転写の刺激後のmRNAレベルのいかなる上昇も翻訳に対応の影響を生ずるからである (8.9)。

tatによるTAR含有mRNAの翻訳制御が活性であると報告された事例はアフリカツメガエルの卵母細胞における場合である。TAR配列を運ぶCAT mRNAはア

特表平6-500012 (4)

アフリカツメガエルの卵母細胞の細胞質に注入されるとときは翻訳されないが、tatプロテインとともに核内にmRNAを同時注入した後に翻訳は回復される(90)。この現象はアフリカツメガエルにおける特殊構造の反映であり得た、すなわちtatによる翻訳制御はHIV増殖を許容する哺乳類細胞において平行マイクロインジェクション実験が行なわれたとき証明されることができなかった(91)。アフリカツメガエルの実験において観察された翻訳遮断が細菌性RNAポリメラーゼによる生体外の転写中に生産された二重鎖RNAフラグメントによるmRNA調製物の混入によるものであることもあり得る。哺乳類細胞の遺伝子翻訳系において、TAR含有mRNAはTAR配列が二重鎖RNA依存性キナーゼを活性化したと思われるためにうまく翻訳されなかっことが報告された(92)。しかしセルロースカラムにおけるクロマトグラフィーによるTAR含有RNA調製物の再精製後、混入二重鎖RNAは除去され、TAR含有mRNA調製物は正常に翻訳された(93)。

TAR配列を運ぶプロモータからの転写を刺激するtatの能力に関する最も簡単な説明は、tatが直接結合によってTAR RNAを認識するということであるが、この相互作用の証明は困難であると判明した。TAR RNAへのtatの特異的結合を証明する初期の試みは、おそらくうまく行なわれなかっただ、なぜならば、RNA混入物

がなく、かつ寡聚物がその7つのシステイン残基の酸化のため形成されない条件下にあるE. coliにおいて発現されたtatを精製することが困難であるからである。しかし改良された方法を使用して我々はtatがTAR RNAを特異的に認識できるということを証明できた。結合は高い親和力($K_d = 12 \text{ nM}$)を示し、tatはTAR RNAとの1対1複合体を形成する(94)。

TARのtat認識は緊密なフランキング塩基対と同様TAR RNAシステムの頂端近くのUの豊富なバルジの存在のみを必要とする。Uの豊富なバルジの配列を変える変異、またはTARシステムループ構造の近くの残基における塩基対合を分断することによってUの豊富なバルジの構造に影響を与える変異は、tat結合およびトランス活性化をいずれも終らせる(10、11、27、28)。対照すると、TARシステム全体の塩基対の多くのものの同一性はワツソン-クリック塩基対が維持される限り、トランス活性化、またはtat結合のための重要な必要条件であるとは思われない。tatによるRNA結合はtatにおけるアルギニン残基とTAR RNAにおけるリン酸塩との間の特異的な塩橋の形成を必然的に伴う。tatからアルギニンの多い配列を運ぶC末端ペプチドは、無傷タンパク質より低い特異性および親和力で結合するが、Uの豊富なバルジでTAR RNAへ結合することもできる(95、96)。

tatおよび外因性RNA結合ドメインを含有するハイブリッドタンパク質を使用する実験は、tatがTAR RNAエレメントを運ぶ未完成転写物へ直接結合した後に転写機構へ与えられるという生化学的証拠を支持する興味深い遺伝的証拠を提示した(97、98)。たとえば、tatからの配列を含む融合タンパク質およびバクテリオファージR17コートタンパク質は、TAR RNA配列がR17オペレータ配列を運ぶRNAシステムループ構造によって完全に置換えられると、HIV LTRからの転写を刺激し得る。TAR RNAのtat認識の場合におけるように、コートタンパク質に関してその親和力を低下するR17 RNAオペレータ配列の変異が生体内のtat-R17融合プロテインによるトランス活性化を対応して低下させるため、結合は直接であると思われる(98)。

TAR RNAへの結合後tatはいかにして遺伝子発現を調節するのであろうか。1つの初期の示唆は、TARが転写因子のための付加的積載部位として作用することによって転写開始速度を刺激するように作用するということであった。除外することは難しいが、このモデルはますますあり得ないものに思われる、それは酵母GAL-4結合ドメインを含む融合タンパク質のための結合部位のみを含むプロモータを含むハイブリッドプロモータがtatに対して高い応答性があるからである。転写開始に影響を与えるRNA結合タンパク質の既知の例はないが、一方転写伸

長を制御するバクテリオファージ・ラムダNタンパク質のようなRNA結合タンパク質の原核生物系には多くの良い例があることも注目されるべきである。

ピーターリン(Petrelli)らはtatがTAR部位またはその近くにおける伸長に対する阻止の克服を助ける抗ターミネータとして作用するという重要な示唆を与えた(38、40、98)。彼らの提案は短い、早期に終了したRNA転写物がtatが存在しないと蓄積するという観察に基づく。しかしTARは単に抗終結部位ではない、それはトランス活性化またはTARの欠失を終了させるTARの変異の結果、LTR発現は構造的に高いレベルにならず、短いRNA転写物を「退跡」して、全長のmRNAにすることが困難であるからである。

TARの下流における特異的ターミネータ配列の同定の失敗によって、tatがRNAポリメラーゼIIのためのより一般的な伸長因子として作用し、単に部位特異的抗終結因子としては作用しないという第3の提案が行なわれた。TARを含有する不完全な転写物上に存在するタンパク質結合部位によって媒介された反応における転写開始直後に、tatおよび細胞の補助因子がRNAポリメラーゼIIとともに集まることがあり得るようと思われる。この修飾された転写複合体は次にTARを含む様々な部位において伸長への付加的阻止を克服することによってウィルスmRNA生産を刺激する。

特表平6-500012 (5)

伸長因子モデルのための強い支持が核の追加実験から得られる。tatが存在しない場合、RNAポリメラーゼはウィルスLTRまたはその近くにおいてのみ見出され得る。しかし、プロモータの下流のRNAポリメラーゼの密度はtatが存在する場合、劇的に増加する(89)。しかし、伸長依存性機構の厳密な論証にはtatに応答する有効な細胞遊離転写系の発達が必要とされるであろう。これらが間もなく利用可能になるであろうという動きによる徴候がある。HIV感染された細胞からの抽出物の添加はウィルスLTRからの転写を刺激する(100)。細菌により合成されたtatが生体外で転写を刺激し得るという最近の報告もあった。不運にも組換tatによる転写の刺激は高濃度の添加タンパク質でインキュベーションを引伸ばした後にのみ最もよく観察される(101)。したがって真性のトランス活性化が生体外で再生されたかどうかは不明瞭なままであり、細胞遊離系の付加的発達は機械的研究が開始し得る前に必要とされるであろう。

この発明の目的は、ウィルス増殖サイクルにおいて調節タンパク質tatの活性を修飾することを伴う、細胞内のHIVウィルス増殖の抑制のための有効な方法、およびそこにおいて使用するための組成物、ならびに潜在する抗ウィルス因子をスクリーニングするための検定を提供することである。

発明の説明

領域のみがtatプロテインを結合するために決定的であるという予期せざる発見に基づく。したがって細胞内への同化が可能なだけ十分に小さい、この特定的結合部位の薬学的に許容可能な核酸、または他の類似体を（化学的、または酵素的）合成することが合理的に実用性がある。

これらの類似体は次に細胞内のtatプロテイン活性の競合抑制因子として使用され得る、すなわちTAR類似体とのその反応を介して細胞中に存在するtatを除去することによって、それらの細胞におけるウィルス増殖が効果的に抑制され得る。

tat結合は、HIVのTAR RNA構造におけるシステムの頂端の近くにバルジを形成する、1つのウリジン(U)残基を含む3つの不対残基の存在に依存するようであることがわかっている。tat結合はtat結合部位の一部も形成するフランキング塩基対の存在にも依存する。この結合部位におけるある変異体は生体外においてtatを結合することも、生体内においてトランス活性化することもできない。それゆえこの小領域（高親和性結合部位であることがわかっている）を含む核酸、または他の類似体はTAR配列において見出される構成をまね、tatプロテインへ結合することができる。

したがって、この発明のオリゴヌクレオチドにおける結合配列は好ましくは、tatプロテインの認識部位をともに形成するHIVのTAR RNAの配列におけるG_{2,3}

この発明の第1の局面に従って、HIVタンパク質tatによって結合される部位に対応する1つまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内のtatへ結合することが可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む分子が提供される。

細胞内でtatを結合することによって、1つまたは複数の結合配列は細胞内に存在するいかなるHIVの増殖も抑制するように作用し得、HIVに感染した患者の治療における潜在的治療にも使用される。

この発明の第2の局面に従って、この発明の第1の局面によって提供されるような分子を含む薬学的組成物が提供される。薬学的組成物は細胞内のHIVの増殖抑制因子として便宜的に使用される。

この発明の第3の局面に従って、HIVに感染した患者の治療における使用のための分子が提供され、この分子はHIVタンパク質tatによって結合される部位に対応する、1つまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内でtatに結合することが可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。

この発明の第4の局面にしたがって、細胞内のHIVの増殖を抑制するための薬剤の製造において、この発明の第1の局面によって提供されるような分子の使用が提供される。

この発明は、TAR配列の極めて小さく、かつ特異的な

-C_{3,8}に対応するフランキング塩基対と共に、HIVのTAR RNAの配列におけるU_{2,3}に対応するウリジン残基を含む3つの不対残基を含む。

このようなTARの小領域が実際にtatを結合するために必要とされるので、好ましくは（しかしこれに限定されない）20個以下の残基の、治療的に有効な長さのオリゴヌクレオチドからなる結合部位の類似体が構成され得る。このような分子は感染された細胞に入り得る可能性が高く、それゆえより長いものよりもHIV感染の生体内治療のための製薬に使用され得る。この発明に従った分子は、HIVウィルスに感染された細胞内への組換えを容易にするために、好ましくは長さにおいて20個以下の残基のオリゴヌクレオチドの形である。

RNAそれ自体が細胞内で代謝的に不安定なため、この発明に使用されるオリゴヌクレオチドは好ましくは細胞内におけるその安定性を増加させるようにある程度修飾される。必然的にRNA配列である結合配列はたとえばDNA塩基配列か、または他の構造的に関連した種々のオリゴヌクレオチドに組込まれてもよく、この塩基配列は全体としてオリゴヌクレオチドへ必要な代謝的安定性を与える。

したがって細胞内に導入されると、tatによって結合される部位に対応するRNA配列を含むいかなるオリゴヌクレオチド（またはオリゴヌクレオチドの組合せ）も、tatを結合することが可能であり、したがってそれらの

特表平6-500012 (6)

細胞内におけるウイルス増殖の競合抑制因子として作用することが可能であるべきである。実際に、TAR RNA結合部位におけるt at tへの結合が可能ないかなる小分子も、抗ウイルス因子として使用され得、この発明は抗HIV因子としての使用のためのこのような分子をその範囲内に含む。このような分子はTAR RNAのRNA構造の形状をまねし得るか、またはTAR RNAのRNA構造と等価の官能基を含み得る。

オリゴヌクレオチドは細胞のリボヌクレアーゼによる開裂に対して感受性であるため、RNA結合配列の作用をまねるがヌクレアーゼ開裂に対して感受性の低い化学的に修飾されたオリゴヌクレオチド（またはオリゴヌクレオチドの組合せ）を競合抑制因子として使用することが好ましいであろう。他の修飾、たとえば結合を高めること、細胞の摂取を高めること、薬理学もしくは薬物動態学を改良すること、または他の薬学的に所望の特性を改良することが要求されてもよい。

オリゴヌクレオチドは天然に存在するオリゴヌクレオチドであるか、修飾された塩基および／もしくは糖ならびに／または結合を有するオリゴヌクレオチドのような構造的に関連した変形物であってもよい。この中で使用される用語「オリゴヌクレオチド」はこのような変形物のすべてを包含すると意図される。

結合部位それ自体か、結合に関与しないオリゴヌクレオ

チドの一部のいずれかへ行なわれるであろう修飾は以下の型を含むであろう（しかしそれらに限定されない）。

a) 骨格の修飾 (後の図5を参照)

i) ホスホロチオエート (XもしくはYもしくはWもしくはZ=SまたはOとして残基を含む2つ以上の組合わせ)

たとえば、Y=S (81)、X=S (49)、YおよびZ=S (45)

ii) メチルホスホネート (たとえばZ=メチル (69))

iii) ホスホルアミデート (Z=N-(アルキル)₂

たとえば、アルキル=メチル、エチル、ブチル

(乙=モルホリンまたはビ

ペラジン) (44)

(XまたはW=N H) (6

4)

iv) ホスホトリエステル (Z=O-アルキル たとえばメチル、エチルなど) (70)

v) リンの存在しない結合 (たとえばカルバメート、アセトアミデート、アセテート) (55、56)

b) 糖の修飾

i) 2'-デオキシヌクレオシド (R=H)

ii) 2'-O-メチル化ヌクレオシド (R=OMe)

(80)

たとえば

i) コレステロール (63)、ポリアミン (62)、他の可溶性ポリマー (たとえばポリエチレングリコール)

ii) アルファ-ヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチド (72)

g) 修飾a) - f) の組合せ

4-チオ-2'-デオキシチミジンと置換された残基を含む修飾されたオリゴヌクレオチドを使用する実験は、同様の修飾されないオリゴリボヌクレオチドよりt at tへうまく結合した。したがって1つまたはそれより多い4-チオ-2'-デオキシチミジン残基の包含によってその、または各オリゴリボヌクレオチドを修飾することが好ましい。

このような修飾されたオリゴヌクレオチドは「アンチセンス」抑制因子としてデザインされたオリゴヌクレオチドと特徴を共有するが、化合物がセンス鎖配列に対応し、かつ作用機構がタンパク質-核酸相互作用に依存し、核酸配列との相互作用には依存しないという点において全く異なることに注目すべきである。

この発明の分子および薬学的組成物は生体内におけるウイルス増殖の抑制のために使用されるとき、経口的に、静脈経路で、または他の任意の適切な方法によって投与されてもよい。これらは生体外、たとえば生体から取出され、輸血の目的で後に必要とされる血液中の細胞におけるウイルス増殖の抑制に使用されてもよい。

iii) 2'-フロオロ-2'-デオキシヌクレオシド (R=F) (61)

c) 塩基の修飾 — (検討のため58を参照)

i) 5の位置で置換された (たとえばメチル、ブロム、フルオロなど) か、またはアミノ基でカルボニル基を置換したピリミジン誘導体 (75)

ii) 特定の窒素原子が欠如した (たとえば7-デアザアデニン、ヒポキサンチン) か、または8の位置で官能基が設けられた (たとえば8-アシドアデニン、8-ブロムアデニン) ブリン誘導体

d) 反応性官能基に共有結合されたオリゴヌクレオチド たとえば

i) ソラレン (71)、フェナントロリン (82)、マスター (83) (共同試薬の必要性を有する、または有さない不可逆性の架橋結合剤)

ii) アクリジン (挿入剤) (75)

iii) チオール誘導体 (タンパク質を含む可逆性ジスルフィド形成) (48)

iv) アルデヒド (シップ塩基形成)

v) アジド、ブロモ基 (UV架橋結合)

vi) エリプチセン (ellipticene) (光分解架橋結合)

(74)

e) 親油基または細胞による摂取の改良が可能な他の試薬に共有結合されたオリゴヌクレオチド

特表平6-500012 (7)

この発明はさらに細胞内のHIVウィルスの増殖を抑制する方法を提供し、この方法はこの発明に従った分子または薬学的組成物を細胞へ投与するステップを含む。

この発明はHIVに感染した患者の治療方法も提供し、この方法はこの発明に従った分子または薬学的組成物を患者へ投与するステップを含む。

この発明はTAR RNAまたはその合成類似体へのtatプロテインの結合を抑制し、抗ウィルス因子としての潜在的用法も有する化合物を同定するための検定の基礎としても使用され得る。

したがってさらなる局面においてこの発明はTAR RNAへのtatプロテインの結合を抑制する化合物を同定するための検定を提供し、この検定は化合物をtatプロテインおよびこの発明に従った分子と反応させることと、その分子へのtatの結合度を決定することを含む。

分子へのtatの結合度を決定し、これを既知の基準についての結果と比較することによって、その化合物によって生じたtat/TAR結合の抑制の程度（競合的または非競合的）が示され得る。

この検定は好ましくはフィルタ結合検定の形式であるが、ゲル運動度シフト検定、分光検定、捕捉検定などのような別の型の検定であってもよい。

TARへの結合に対して競合する競合分子または非競合的にTARへのtat結合を抑制する分子のような阻害分

子が存在する場合のTAR RNAに対するtatの親和力の正確な測定は、tatプロテインとTAR RNAとの間の化学量論的複合体の形成なしには達成され得ず、これはE. coliからtatプロテインの精製の、および結合検定を行なうための方法の改良結果として生体外において現在可能である。

tat/TAR結合における抑制効果を有すると同定された化合物は抗ウィルス因子としての可能な使用についてさらに研究され得る。この発明はしたがって潜在的抗ウィルス化合物のスクリーニングを可能にし得る。

この発明は該付の箇面を参照して例示によってこれよりより詳細に説明されるであろう。

図1はHIV-1遺伝子発現を制御する遺伝子要素および細胞因子を示す。

図2はRNA結合タンパク質tatおよびrevがいかにしてHIV-1遺伝子発現を制御するかを示す。

図3はtatの生体内活性および生体外結合のために必要とされるHIV-1 TAR RNAにおけるそれらの配列を示す。

図4はtat濃度($\times 10^{-8}$ M)に対するフラクション範囲のグラフであり、TAR RNA中のウリジンの豊富なバルジ（「Uの豊富な泡」）がtat結合に必須であることを示す。

図5は潜在的抗ウィルス活性を示すであろう修飾された

オリゴヌクレオチドの構造を示す。

図6は様々な変異体のTAR RNA配列を使用するゲル遮断tat結合検定の結果を示す。

図7はRNA競合濃度(μM)に対する³²P標識HIV-1 TAR RNAのフラクション範囲のグラフの形式で様々な変異体のTAR RNA配列を使用するフィルタ結合検定の結果を示す。

図8はtatについて既知の親和力を有する変異体TAR配列を使用する形質移入実験の結果を示し、プラスミドDNA(ug)に対するCAT活性(%アセチル化/10uI抽出物)のグラフの形式で生体内のトランスクレッショナル活性化におけるTAR変異の影響を示す。

図9aはタンパク質濃度(nM)に対するフラクションRNA範囲の飽和結合曲線を示し、図9bはtat/TAR相互作用の化学量論を決定するために使用されるTARへのtat結合のスキヤッチャード分析である。

図10は競合RNA(nM)に対するフラクション³²P標識TAR RNA範囲のグラフであり、TAR RNAと、バルジにおいて配列CUUを運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図11は図10に類似のグラフであり、TAR RNAとバルジにおいて配列CCCを運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図12は図10と類似のグラフであり、TAR RNA

とTAR RNAシステムにおける位置40でA残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図13は図10と類似のグラフであり、TAR RNAとTAR RNAシステムにおいて位置22でU残基を運び、位置40でA残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図14は図10に類似のグラフであり、TAR RNAとTAR RNAシステムにおける位置22でG残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図15は図10に類似のグラフであり、TR RNAとRR RNAシステムにおける位置39でG残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図16は図10に類似のグラフであり、TAR RNAとTAR RNAシステムにおける位置26でC残基を運び、位置39でG残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図17は図10に類似のグラフであり、TAR RNAとTAR RNAシステムにおける位置26でA残基を運び、位置39でU残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図18はa)全長59mer TAR転写物のRNA配列、b) TARの頂部に対応する化学的に合成された29merのRNA配列、c)アニーリングされたときtat結合部位を表わすUの豊富なバルジおよびフランギング塩

特表平6-500012 (8)

基対を形成する 14 および 17 長の化学的に合成されたオリゴヌクレオチドの RNA 配列を示す。

図 19 は競合フィルタ結合検定の結果を示す、競合 RNA (nM) に対する保持される % 計数のグラフであり、化学的に合成された 29mer または化学的に合成された 17mer + 14mer から形成された二重鎖の RNA が各場合において酵素的に合成された 59mer の RNA 転写物とほとんど同じように tat への結合に対して競合することを証明する。

図 20 は a) $U_{2,3}$ が 2' - デオキシウリジン (dU) または 2' - 2' - O-メチルウリジン (2' - O-Me U) のいずれかによって置換された場合の化学的に合成された 29mer の RNA 配列、および b) $U_{2,3}$ または $U_{2,4}$ または $U_{2,5}$ が 2' - デオキシチミジン (dT) または 5-プロモ-2' - デオキシウリジン (Br dU) によって置換された場合の、14mer にアニーリングされて二重鎖の RNA を形成する化学的に合成された 17mer の RNA 配列を示す。

図 21 は競合フィルタ結合検定の結果を示す図 19 に類似のグラフであり、dU または 2' - O-Me U のいずれかによって $U_{2,3}$ で置換された化学的に合成された 29mer が各場合において修飾されない 29mer と同様に tat 結合に対して競合することを証明する。

図 22 は競合フィルタ結合検定の結果を示す図 19 に類似のグラフであり、4-チオ dT によって $U_{2,3}$ または $U_{2,5}$ のいずれかで置換された 18mer へアニーリングされた 15mer からなる二重鎖 RNA が各場合において修飾されない二重鎖よりうまく結合に対して競合することを証明する。4-チオ dT によって置換された $U_{2,5}$ 類似体は修飾されない 59mer と同様に競合する。

または $U_{2,5}$ のいずれかで置換された 18mer へアニーリングされた 15mer からなる二重鎖 RNA が各場合において修飾されない二重鎖よりうまく結合に対して競合することを証明する。4-チオ dT によって置換された $U_{2,5}$ 類似体は修飾されない 59mer と同様に競合する。

図面の詳細な説明

図 1

HIV-1 遺伝子発現の構造が概略的に示される。新たに感染した細胞において、LTRへの細胞転写因子の結合は (1) で示される tat、rev および nef をコードする初期の mRNA の転写の基底レベルを刺激する。tat レベルが細胞中で上昇するにともない、転写はトランスクレアーゼ活性化機構によって刺激される。この結果初期の mRNA の生産は増加され、核内に部分的にスプライシングされた、またはスプライシングされない RNA 転写物が蓄積される (2)。細胞内における rev レベルの上昇に伴い、rev 応答性エレメントを運ぶ RNA は核から移出される。これらは gag、pol および env によってコードされた構造タンパク質のために mRNA として作用する。全長の HIV 転写物は gag-pol のための mRNA としても、かつウイルス粒子 RNA としても作用する (3)。

図 2 調節 RNA tat (TAR、トランスクレアーゼ活性化応答領域) および rev (RRE、rev 応答領域) の位置および配列が HIV 遺伝地図の下に示される。

似たグラフであり、dT によって $U_{2,3}$ または $U_{2,4}$ で置換された 17mer にアニーリングされた 14mer からなる二重鎖 RNA は各場合において修飾されない二重鎖と同様 tat 結合に対して競合するが、dT によって $U_{2,5}$ で置換された二重鎖は修飾されない二重鎖に比べるとうまく競合しないということを証明する。

図 23 は競合フィルタ結合検定の結果を示す図 19 に類似のグラフであり、Br dU によって $U_{2,3}$ で置換された 17mer にアニーリングされた 14mer からなる二重鎖 RNA は tat 結合に対してうまく競合しないが、 $U_{2,4}$ で置換されたものは置換されない二重鎖と比べると同じように競合することを証明する。

図 24 は競合フィルタ結合検定の結果を示す図 19 に類似のグラフであり、Br dU によって $U_{2,3}$ で置換された 17mer へアニーリングされた 14mer からなる二重鎖 RNA が置換されない二重鎖と比べると同様に tat 結合に対して競合することを証明する。

図 25 は 15 および 18 長の化学的に合成されたオリゴヌクレオチドを示し、これはアニーリングされたとき U の豊富なバルジを含む二重鎖 RNA を形成するが、そこで $U_{2,3}$ 、 $U_{2,4}$ または $U_{2,5}$ は各場合において 4-チオ-2' - デオキシチミジンによって置換される。

図 26 は競合フィルタ結合検定の結果を示す図 19 に類似のグラフであり、4-チオ dT によって $U_{2,3}$ 、 $U_{2,4}$

または $U_{2,5}$ のいずれかで置換された 18mer へアニーリングされた 15mer からなる二重鎖 RNA が各場合において修飾されない二重鎖よりうまく結合に対して競合することを証明する。4-チオ dT によって置換された $U_{2,5}$ 類似体は修飾されない 59mer と同様に競合する。

図 3 TAR 領域の構造を変える変異体の最近の研究は、TAR RNA 配列が生じるべきトランスクレアーゼ活性化のために核内で転写され、正しく折り畳まれねばならないということを強く示唆する。TAR RNA 配列は安定したヌクレオチド抵抗性ステムループ構造を取り入れる (5)。この構造の 2 つの顕著な特徴はループ配列 (残基 30-35) および二重螺旋システムの先端近くに位置決めされた 3 つの塩基対を形成しない残基 (残基 23-25) によって作り出された「バルジ」である。TAR におけるバルジおよびループ配列はいずれも HIV-1 と HIV-2 との間に保存され (8, 9) いずれの領域もタクレオチド + 19 および + 42 の間に位置決めされた官能基が活性の最小の TA 配列に存在する (5, 10-14)。

TAR における tat のための認識部位を正確に位置付けるために、E. coli (8, 94) において発現された精製された tat プロテインの HIV-1 TAR 変異を含む転写物を結合する能力が研究された。前の実験はアンチセンス TAR RNA 配列が 15 の位置でしか TAR と異ならなかったにもかかわらず、tat を結合できないこと (6) を示した (図 3 を参照)。TAR への tat 結合へのこれらの配列の変化の各々の寄与を検定するために、一連の TAR 分子が構成され、これはステムまたはループ構造における一連の変異と同様、ループ、上部ステムまたは下部ステムのいずれかのセンスまたはアンチセンス配列

特表平6-500012 (9)

を有する(図3)。HIV-1 tatはHIV-2 TARの第1のステムループを通じLTRをトランス活性化することができる(20、25)。2つのTAR配列が緊密に相関せず(8、9)、かつループおよびバルジ領域における残基のみが保持されるため、この配列がHIV-1 tatを結合することができるか否かを決定することも興味深かった。

図8において、TAR RNA配列および提案された二次構造が示され、番号付けは位置+1におけるキャップされたG残基に関する。提案された二次構造はTAR RNAの前の分析に基づく(5)。HIV-1_{wu} TARおよびHIV-2_{sw} TARのいずれにも存在する保持された配列の特徴はボックスに入れられ、かつ影を付けられる。センス配列と異なるHIV-1 TARへのアンチセンス配列における配列はボックスに入れられる。矢印はRNA構造の下部システム、上部システム(Uの豊富な泡を含む)およびループへの分割点を示す。SSA:センスシステム、アンチセンスループ配列。ASS:アンチセンス下部システム、センス上部システムおよびループ配列。SAS:センス下部システムおよびループ配列によってフランギングされたアンチセンス上部システム。アンチセンス:HIV-1_{wu} TARへのアンチセンス配列。G3からU3へ(ループ):残基32-34がウリジン(U)へ転換される。デルタU3(バルジ):残基23-25が欠失される。

モルの³²Pで均一に放射性標識付けられたTAR RNAと、0.5ug子ウシ胸腺DNAと、0.2ug酵母tRNAと、40単位RNasin(プロメガ)と、50mM Tris-HCl pH7.9および20mM KC1を含んだ実験からのものである。反応混合物は水の上に据えられ、増加する量のHIV-1 tatタンパク質が加えられ、その反応混合物は予め洗浄されたニトロセルロースフィルタ(ミリポア(Millipore) 0.45μM孔径サイズ)を介して通過された。フィルタは乾燥され、液体シンチレーション計数によって数えられた。放射性標識付けられたRNAのフラクション限界はHIV-1 tat濃度に対してプロットされた。

TAR:野生型TAR RNA(HIV-1_{wu}配列)。
U3欠失:8つのウリジン(U)残基(残基23-25)
が欠失されたTAR RNA配列。
U3からG3へ:3つのウリジン(U)残基(残基23
-25)がグアニン(G)へ転換されたTAR RNA配列。

図5はこのようなRNAフラグメントの合成における使用が可能なオリゴヌクレオチドの構造を示す。ヌクレオチドに対するその感受性を低下するか、さもなければその安定性を向上するために、オリゴヌクレオチドへの修飾は前述のように塩基B1およびB2の構造、糖骨格Rまたはリン酸結合W、X、YおよびZへの変更を含んでもよい。

U3からG3へ(バルジ):残基23-25がグアニン(G)に転換される。G₂₆からC₂₆へ:TARシステム/ループ構造の頂部を分断することが予想された点変異。G₂₆からC₂₆へ+C₂₇からG₂₇へ:正常なTARシステム/ループ構造を有することが予想された対の点変異。

図4 ラボラトリ・オブ・モレキュラ・バイオロジ(Laboratory of Molecular Biology)(ケンブリッジ(Cambridge))における研究は、HIV-1 tatプロテインが見かけの解離定数12nMを有するゲル遮延、フィルタ結合およびイムノプレシビテーション検定においてHIV-1 TAR RNAに特異的に結合することを示した(6、94)。

HIV-1 tatはHIV-2 TAR配列にも特異的に結合する(以下、ならびに図6および7を参照)。HIV-1およびHIV-2 TAR配列間で共有される相同的の唯一の領域がループ領域およびUの豊富な泡を含むシステムの短い領域における残基であるため、tat結合部位はこれらの領域の1つの中に位置決めされることになる。

これらの配列の各々における残基を変える一連の変異が調製される。生体外におけるtat結合は無傷のUの豊富な領域配列の存在に依存するが、ループからは大きく独立している。

図4にグラフで示される結果は、結合反応物(500uI)が100,000Ci/molの比活性において40n

図6および7はゲル遮延およびフィルタ結合検定実験の結果をそれぞれ示し、HIV-2 TAR RNAにおける第1のステムループ構造へのHIV-1 tatの結合を証明する。使用される方法および得られた結果は以下に概説される。

1) ゲル遮延検定(図6)

方法

RNA転写物はTAR領域残基+1ないし+57のT3またはT7 RNAポリメラーゼのいずれかでの転写によって調製され、ブルースクリーブ(Hitribi) M13'発現ベクター(Hitribi)のHindIIIとEcoRI部位の間でクローン化された。HIV-1 TAR、SSA、SAAおよびSASに対応するRNA転写物はEcoRIで線状にされ、かつT3 RNAポリメラーゼで転写されたクローンから合成された。アンチセンスHIV-1 TAR、AAS、ASSおよびASA(図示せず)配列に対応するRNA転写物はHindIIIで線状にされ、かつT7 RNAポリメラーゼを使って転写された同一のプラスミドから調製された。すべての他のRNA分子はプラスミドベクターのEcoRI開裂に続くT3 RNAポリメラーゼを使用して合成された。RNA生産物は各々その5'末端でベクター配列の13のヌクレオチドおよびその3'末端で4つのヌクレオチドを運ぶ。これらの配列はtatのTAR(8)への結合に影響を及ぼさない。転写

特表平6-500012 (10)

混合物は30 u lの最終容量において、1 u gの線状にされたプラスミド、40 mMのトリス (Tris) - HCl pH 8.0、10 mMのMgCl₂、2 mMのスペルミジン (Spermidine) - HCl、50 mMのNaCl、各々100 u Mのリボヌクレオチド三リン酸、40 u Ci (アルファ-³²P) UTP (410 Ci/m mol) および10ユニットのRNAポリメラーゼを含み、37°Cで30分間インキュベートされた。エタノールからのフェノール抽出および沈殿後、RNAは9%ポリアクリルアミド変性ゲルから精製された。RNA生産物の比活性が決定され、適切な量が結合検定で使用された。結合反応混合物 (15 u l) は1 n gの均一に標識したRNAプローブ、0.5 u gの子ウシ胸腺DNA、0.2 u gの酵母tRNA、40ユニットのRNA引物 (プロメガ (Promega))、50 mMのトリス-HClおよび20 mMのKClおよび0ないし600 ngのtatプロテインを含み、以前 (6) に説明されたようにE. coliベーターガラクトシダーゼ-tat融合タンパク質から調製された。10ないし20分間30°Cか4°Cのいずれかでインキュベーションした後、反応混合物は3.3 mM酢酸ナトリウム、6.7 mMトリス (HClでpH 7.9に調整された) 中6%の非変性ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド (acrylamide) : ビス (Bis) : 40:0.5) に与えられた。ゲル緩衝液は室温で約2時間35 mAでの電気泳動の間再循環され

た。ゲルは乾燥され、強調スクリーンを使用して-80°CでX線フィルムに写された。

結果

図6のオートラジオグラフはtatとHIV-1 TAR、HIV-2 TAR、SSA、ASS、およびGからUへ (ループ) の³²P標識したRNA転写物との間での分離した複合体形成を示す。複合体は、SAS、AAS、デルタU3 (バルジ) 、UからGへ (バルジ) またはアンチセンス配列とは何も形成されなかった。各ゲルレーンの上の数字は各反応混合物に加えられた200 ng/u lでのHIV-1 tatプロテインのu lを示す。RNA配列は図3に示されるとおりである。

ゲル遮延 (図6) およびセンス/アンチセンスキメタを使用するフィルタ結合検定 (データは図示せず) もまた、TARへのtat結合は常にシステムの上部領域にあるがループにはないセンス配列の存在に依存することを示した。このように変異体ASS、SSAおよびASAの各々が野生型の親和力でtatを結合し、一方変異体SAS、AASおよびSAAの各々は大幅に低減された親和力でtatを結合し、ゲル遮延検定 (図6) で複合体を形成できない。これはtat結合部位はTARの上部システム領域に置かれなければならないという仮定のさらなる証拠である (図3)。

II) フィルタ結合検定 (図7)

結合検定における改良点は、ほぼ等モル濃度のタンパク質およびRNAを使用してtatとTAR RNAとの間の複合体の形成を考慮した。これらの検定において、tatへの低減された結合を示すTAR変異体もまた、野生型のRNA配列に結合するtatの弱い競合阻害剤である。たとえば、競合結合検定において、Uの豊富な泡の3つのU残基の各々がG残基によって置換されるTAR変異体は240 nMの見かけのK_dを有する。

方法

競合RNAは40 mMのトリス-HCl pH 7.6、25 mMのNaCl、16 mMのMgCl₂、10 mMのジチオトレイトルおよび100 u gの純粋なT3 RNAポリメラーゼを含む2.5 mlの反応混合物中100 u gの適切なDNA錠型の転写によって生産された。ポリメラーゼ酵素はプラスミド (pCM56) (26) を使用するE. coli BL21における過発現によって生産された。結合反応物 (500 u l) は氷上で生じ、80 pMの³²P標識したTAR RNA (17,600 dpm、200 u Ci/n mol) および標識していないTAR RNAを含み、20 nMの最終濃度、0.5 u gの子ウシ胸腺DNA、0.2 u gの酵母tRNA、40ユニットのRNA引物 (プロメガ)、50 mMのトリスHClおよび20 mMのKClを与えた。競合RNAを加えた後、結合は400 ng/ml (40 nM) の最終濃度までHIV

-1 tatプロテインを添加することによって開始された。結合反応混合物はそれから予め水洗されたニトロセルロースフィルタ (ミリポア0.45 u M孔サイズ) を介して減圧下で通過され、フィルタは乾燥され、液体シンチレーション計数によってカウントされた。

結果

図7に示されるグラフはTAR RNAと様々な変異体TAR配列との間のtat結合に対する競合を例示する。数値データは表1に与えられる。³²P標識したTAR RNA範囲のフラクションは、競合RNAの最終濃度に対してプロットされた。この実験で使用されたTARの配列および様々なTAR変異体は図3に示されるとおりである。これらの実験において、反応物は20 nMのTARおよび40 nMのtatプロテインおよび40 nMから6 u Mの増大する量の標識していない競合RNAを含んだ。このグラフは2 u Mより大きい競合RNA濃度で得られたデータを含んでいない。直接フィルタ結合検定で測定されるように、複合体におけるtatとTARとの等モル比およびK_d=12 nMを仮定すると、入れたTAR RNAの70%は競合RNAがない場合にフィルタ上で保持されることが予期される。理論上、40 nMのtatは純TAR RNA濃度が56 nMである場合に入れたTAR RNAの50% (D_{1/2}) を結合するであろう。この値は64 nMのTARのD_{1/2}に対する測定値とよく一致する (パネル

特表平6-500012 (11)

a)。低い親和力で tat を結合する TAR 变異体は弱いコンペチターであり、D_{1/2} に対してより高い値を与える。

tat によって弱く結合される TAR RNA 配列もまた、したがって、溶液中の結合の弱い競合阻害剤である。直接結合検定 ($K_d = 30 \text{ nM}$ - 表1)、または競合結合検定 (図7a および表1、D_{1/2} = 160 nM) において測定される HIV-2 TARに対する tat の親和力は、HIV-1 TARに対するものよりほぼ 2.5 倍低かった。バルジ U 残基の G 残基との置換はゲル遮蔽検定における TARへの tat 結合を終らせ (図6)、tat 親和力の劇的な低減、D_{1/2} = 400 nM、100 nM より大きいK_d を生じた (図7c および表1)。U の豊富なバルジの遺伝子欠失もまたゲル遮蔽検定において TARへの tat 結合を終らせ (図6)、D_{1/2} を 290 nM、70 nM より大きいK_d まで増大させた。対照的に、ループ配列の 3 つの G 残基の U 残基との置換はほぼ野生型の親和力、D_{1/2} = 66 nM、K_d = 25 nM で tat を結合することが可能な RNA 分子を生じた (図6 および図7c ならびに表1)。G_{2,3} の C 残基との置換は U の豊富なバルジとループとの間のステムを脱安定化させることが予期される (図3)。この変異体はゲル遮蔽検定において tat に結合すること (図6)、または効率的に競合すること (図7b および表1、D_{1/2} = 680 nM、K_d = 100 nM) ができないが、結合は C_{3,7} の G_{3,7} への第 2 の変異

より大きい補償によって回復された (図7b および表1、D_{1/2} = 76 nM、K_d = 24 nM)。

TARセンス/アンチセンスキメラを使用する競合実験は行なわれなかった、なぜなら TAR RNA は室温でアンチセンス RNA と容易にアニールし、tat/TAR 競合体 (データは図示せず) のそれに類似のポリアクリルアミドゲル中で移動性を有する安定した二重鎖を生じるからである。このハイブリッド形成反応は TARへのタンパク質結合に干渉することが予期される。

図8

もし TARへの tat 結合がトランス活性化に必要であれば、tat に対する低親和力を有する TAR 配列を運ぶウイルスLTRは、生体内の tat 依存プロモータ活性を常に低減したはずである。TAR 上での部位定方向突然変異実験は、トランス活性化は U の豊富なバルジ (1, 11) およびループ配列 (1, 2, 27, 28) の双方における配列を必要とする事を示した。これらの観察はトランスフェクション実験において tat に対して既知の親和力を有する TAR 変異を使用して拡大され、その結果は図8 に示される。これらの実験は HeLa 細胞 (図8a-d) かまたは tat の構造性生産体、HeLa/C63/tat 細胞 (図8e-f) のいずれかを使用した。

図3に描かれた TAR 配列は、LTR および感染性プロウイルスクローン NL4 (29) に由来する 5' フランキ

ング配列のはば 300 の塩基を運ぶテストプラスミド、p D5-3-3 に導入された。細胞性クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子および SV-40 イントロンおよび pSV2-CAT (30) からのターミネーター配列は、+77 で HindIII 部位にクローニングすることによって TAR の下流に挿入された。トランス活性化は HeLa 細胞のテストプラスミドおよび tat 発現プラスミド pC63-4-1 (6) (図10 のパネル a-d) との同時トランスフェクションか、または HeLa/C63/tat (クローン 9) 細胞 (パネル e-h) へのテストプラスミド単独のトランスフェクションのいずれかによって測定された。

これらの実験において、細胞は T25 フラスコの中で 3 × 10⁵ の密度でプレート培養され、リン酸カルシウム法 (31) によってトランスフェクトされた。HeLa 細胞中のトランスフェクションは、8.0 ug のテストプラスミド、1.0ないし 10 ug の pC63-4-1 プラスミド、および 10 ug の子ウシ胸腺粗体 DNA を使用した。HeLa/C63/tat (クローン 9) 細胞のトランスフェクションは、0.5ないし 10 ug のテストプラスミドおよび 10 ug の子ウシ胸腺粗体 DNA を使用した。HeLa/C63/tat (クローン 9) 細胞は、HeLa 細胞のヘルバーフリーの両栄養性 C63-4-1 MoMuLV-tat ウィルスでの感染によって調製された。2 m

g/m1 G418 における選択の後、個々のクローンは伸長され、tat プロテインの発現は tat へのモノクローナル抗体を用いるイムノブレシビティーションによって確認された (6)。細胞抽出物は 150 uL の溶解緩衝液 (0.2% の NP40、20 mM のトリス pH 8.0、4 mM の MgCl₂) 中でのトランスフェクション後 48 時間で調製され、65°C で 10 分間熱不活化され、-20°C で保存された。CAT 活性が検定 (30) の直線の範囲で測定されたことを確実にするために、そのアセチル化された形でのクロラムフェニコールの 50% 未満の転換において、各トランスフェクションに対して、5 から 70 uL の抽出物を含む 3 つの異なるアリコートが CAT 活性について検定された。反応物は 70 uL、10 uL の Acco A (溶解緩衝液中の 2.5 mg/m1)、0.5 uL (14 C)-クロラムフェニコール (60 mCi/mmole) の最終容量まで溶解緩衝液で希釈された抽出物を含み、45 分間 37°C でインキュベートされた。反応生産物は酢酸エチルで抽出され、シリカプレート上の薄層クロマトグラフィーによって分離され、バンドは抽出物の 10 uL 当たりのクロラムフェニコール転換効率を計算するためにシンチレーション流体中でカウントされた。

HIV-1 TAR 領域を運ぶウイルス LTR は、tat プラスミドの最適レベルが存在するところでは 40 倍と 150 倍との間の CAT 活性の基底レベルを超える上昇を

特表平6-500012 (12)

示した。バルジ領域（デルタU、UからGへ、SAS、AAS）かまたはループ領域（SSA、ASA）のいずれかにおける変異は、トランスクレベラーゼ活性において4ないし20分の1の低減を生じた。バルジまたはループ領域における変化を有するすべてのLTRは無傷のTAR領域を有するLTRより際立って活性的ではなかったが、上部ステムおよびループ領域の双方に対して変化を有する変異体SAAのみが、高いtatプロテイン濃度で基底レベルを超えるLTR活性の実質的な上昇を示さなかった。G28のC28への点変異もまた欠陥表現型を生じ、それはC37のG37への補償突然変異によって野生型レベルに回復された（図8a）。

HeLa/C63/tat細胞において、HIV-1 LTRによって促進された最高のCAT発現は、HeLa細胞の最適tatプラスミド濃度でのCAT発現より2ないし3倍低かった。これはHeLa/C63/tat細胞におけるtat発現のレベルがトランスクレベラーゼ活性で達成されたtat発現の最高レベルより幾分低かったことを示す（図8e-h）。HeLa/C63/tat細胞においては、変異体SSA、SAA、ASA、SASまたはAASに対して観察されたCAT発現の基底レベルを超える十分な上昇がなかった（図8gないしh）。Uの豊富なバルジ（デルタU、図8f）の遺伝子欠失またはG28のC28への点変異（図8e）もまたタル表現型

を生じた。対照的に、ASSプラスミドは野生型発現レベルを示した（図8g）。しかしながら、バルジにおいてU残基がG残基に置換された場合（UからGへ、図8f）、またはG残基がループにおいてU残基に置換された場合（GからUへ、図8f）、高いプラスミド濃度で著しいCAT活性が観察された。

TAR RNAへのtat結合の化学量論（図9）

ケンブリッジ(Cambridge)の分子生物学研究所(The Laboratory of Molecular Biology)での初期研究は、tatプロテインとTAR RNAとの間の配列特異的相互作用を示した(6)。しかしながら、tatの重要なフラクションは適切に折り畳まれなかったかもしれません、かつ解離定数から出された推定値(30nMより小さいKd)はむしろ概算であるという懸念があった、なぜなら測定はタンパク質の高いモル濃度(1,000ないし10,000倍)で行なわれたからである。結合検定におけるtatプロテインの調製およびRNAの高濃度の用途の双方における改良点（“方法”以下および引用文献9-4を見られたい）は、タンパク質およびRNAの等濃度を使用する複合体形成の証明、およびTAR RNAへのtat結合に対する配列要求の詳細な研究を考慮に入れた。

図9aは飽和結合実験の結果を示し、その実験において一定濃度の標識したRNA(10nM)は上昇する濃度のtatプロテインでインキュベートされ、ニトロセルロー

スフィルタ上に保持されたRNAのフラクションが測定された。結合は“方法”で以下に説明されるようにフィルタ結合検定によって測定され、E. coliにおいて発現されたヒト成長ホルモン-tat融合タンパク質のCNBr開裂によって調製された単量体のtatプロテインを使用した。飽和結合に対する反応物は10nMで標識したTAR RNAまたはアンチセンスTAR RNAを含み、0ないし300nMの間で精製されたtatタンパク質を含んだ。アンチセンスTAR RNAは対照として使用された、なぜならアンチセンスTAR RNAはゲル電気泳動においてtatとともに安定した複合体を形成することができないからである（ディングウォール（Dingwall）他、1989年）。

tatは $K_d = 12\text{ nM}$ の見かけの解離定数でHIV-1 TAR RNAに結合したが、アンチセンスRNAへの結合は大幅に低減された(140nMより大きい K_d)。判然としない結果が感染分子クローニングで発見されたUUUかまたはUCUかのいずれかのバルジ配列を有するHIV-1 TAR配列を使用して得られた（表1）。

tat/TAR相互作用の化学量論は広い範囲にわたってTAR RNA濃度を変える一方で、tatプロテイン濃度を K_d 近くで一定に保つことによって決定された。データのスキャッチャードプロットは図9bに示される。このスキャッチャード分析のために、tatプロテイン濃度

は40nMで一定に保持され、RNA濃度は7nMと320nMとの間で変化した。標識したRNAの総量は結合反応物において一定に保たれたが、RNAの比活性は変化した。縦座標は化学量論、v、タンパク質のモル当り結合されたRNAのモル数である。横座標はvの逆離RNA濃度に対する比である。切片は約1の化学量論、vに対する値を与える、線の傾きは最小自乗法によってデータに当てはめられ、11.8nMの K_d を示し、飽和結合実験から得られた値と非常によく一致した。これらの結果はtatはTARと1対1の複合体を形成し、かつ新しい調製物における本質的にすべてのtatモノマーはRNA結合において活性であることを示す。

方法

a) tatプロテインの調製

tatプロテインはベータ-ガラクトシダーゼ-tat融合タンパク質(6)かまたはヒト成長ホルモン-tat融合タンパク質(85)かのいずれかから改良された方法を使用して調製された。要するに、融合タンパク質を含む封入体ペレットは7MのGdHCl、50mMのトリス-HCl pH8.0、2mMのEDTA、2mMのDTT中で可溶化され、融合タンパク質は6Mの尿素、50mMのトリス-HCl pH8.0、2mMのEDTA、2mMのDTTを含む緩衝液中のQ-セファロースおよびS-セファロース（ファーマシア（Pharmacia））上のイオン

特表平6-500012 (13)

交換クロマトグラフィーによってほぼ均質になるまで精製された。システイン残基は20 mM 2-ヒドロキシエチルジスルフィドとのジスルフィド交換によって保護された(86)、かつタンパク質は臭化シアンによって開裂された(6)。塩基性 tat プロテインはそれから 6 M の尿素中の Q-セファロースおよび S-セファロース上のイオン交換クロマトグラフィーによって酸性ヒト成長ホルモンペプチドから分離された。保護基はそれから 10 mM の DTT を加えることによってタンパク質から除去され、タンパク質は 50 mM のトリス-HCl pH 8.0、100 uM の DTT、10 uM の ZnCl₂ を含む緩衝液中で、6 M の尿素、5 M の尿素、3 M の尿素、1 M の尿素および 0 M の尿素に対する段階的な透析によって再生された。この様で再生された tat プロテインはセファロース 12 カラム (ファーマシア) からモノマーとして溶出し、單一バンドとしてポリアクリルアミドゲル上で移動する。双方の方法によって調製されたタンパク質は結合検定において共通した挙動を示した。

b) TAR RNA の調製

RNA 転写物は TAR 領域残基 + 1 ないし + 57 の T3 かまたは T7 のいずれかの RNA ポリメラーゼでの転写によって調製され、ブルースクリープ M13⁺ 発現ベクター (Sanger et al.) の HindIII と EcoRI 部位との間でクローン化された。HIV-1 TAR、SSA、SA

A および SAS に対応する RNA 転写物は、EcoRI で線状にされ T3 RNA ポリメラーゼで転写されたクローンから合成された。アンチセンス HIV-1 TAR、A AS、ASS および ASA (図示せず) 配列に対応する RNA 転写物は、HindIII で線状にされ、かつ T7 RNA ポリメラーゼを使用して転写された同一のプラスミドから調製された。すべての他の RNA 分子はプラスミドベクターの EcoRI 開裂の後、T3 RNA ポリメラーゼを使用して合成された。RNA 生産物は各々その 5' 末端でベクター配列の 13 のヌクレオチドを選び、その 3' 末端で 4 つのヌクレオチドを選び。転写混合物は 30 uL の最終容量中に 1 uL の線状にされたプラスミド、40 mM のトリス (Tris) - HCl pH 8.0、10 mM の MgCl₂、2 mM のスペルミシン (Spermidine) - HCl、50 mM の NaCl、各 100 uM のリボヌクレオチド三リン酸、40 uCi (アルファ-³²P) UTP (410 Ci/mmol) および 10 ユニットの RNA ポリメラーゼを含み、37°C で 80 分間インキュベートされた。エタノールからのフェノール抽出および沈殿後、RNA は 9% のポリアクリルアミド変性ゲルから精製された。RNA 生産物の特異的な活性が決定され、適切な量が結合検定で使用された。

結合検定のための大量の RNA が 40 mM のトリス-HCl pH 7.6、25 mM の NaCl、16 mM の Mg

Cl₂、10 mM の DTT、各 3 mM のリボヌクレオチド三リン酸および 100 uL の純粋な T3 RNA ポリメラーゼを含む 2.5 mL の反応混合物中の 100 uL の適切な線状 DNA 錐型の転写によって生産された。ポリメラーゼ酵素はプラスミド pCM56 (モリス (Morris) 他、1986 年) を使用して E. coli K-12 BL21 における過発現によって生産された。RNA は予想的な変性ゲル電気泳動によって精製され、0.5 ないし 1 mg の純粋な RNA はこの方法によってルーチン的に生産された。

ヌクレアーゼ消化実験 (データは図示せず) は TAR RNA の 3' および 5' 側の短い伸張の存在は、ミューシング (Muessig) 他 (5) によって説明された型の RNA へアビンループを形成するためこれらの配列の能力に影響を及ぼさないことを示した。T7 かまたは T3 のいずれかの転写反応物から調製された TAR RNA、またはオリゴヌクレオチド錐型 (6) から調製された TAR RNA は区別できないほどに tat を結合する。さらに、HIV 転写物の第一の 110 ヌクレオチドを介して TAR 配列を伸張するより長い RNA 分子は、行なわれた実験の大半で使用された 59 ヌクレオチド長の転写物と同等に tat を結合する (データは図示せず)。

c) フィルタ結合検定

tat プロテインの TAR RNA への結合に影響を及ぼす様々なパラメータが研究され、結合条件が最適化され

た。tat の TAR への結合は pH 8.0 ではっきりした pH 最適条件を有するが、良好な結合は pH 7.5 と pH 8.5 との間で観察される。tat/TAR 复合体はイオン強度に非常に影響されやすい。複合体形成は 100 mM より多い NaCl または 100 mM より多い KCl によって強く抑制され、最適の全体のイオン強度は 0.08 uM である。Zn²⁺、Cd²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺ または Fe³⁺ イオンの反応混合物への添加は複合体形成に影響を及ぼさない。しかしながら、結合反応物は 0.1 mM より多い EDTA で EDTA に影響されやすい。複合体形成はまた幾分温度にも影響されやすい。最適の結合は 0.℃ で観察される。15°C と 30°C との間で、複合体形成に 30% の低減がある。参考文献 110 の図 2 を見られたい。

結合実験のために、結合反応物 (500 uL) は氷上で生じ、8.0 pM ³²P 標識した TAR RNA (17.6 000 dpm、200 uCi/nmol) および標識していない最終濃度が 20 nM の TAR RNA、0.5 uL の子ウシ脳膜 DNA、0.2 uL の酵母 tRNA、40 ユニットの RNasin (プロメガ)、50 mM のトリス-HCl pH 7.9 および 20 mM の KCl を含有した。0.5 ないし 6 uM の競合 RNA を添加した後、結合は HIV-1 tat プロテインを 400 ng/mL (40 nM) の最終濃度まで添加することによって開始された。結合反応

特表平6-500012 (14)

混合物はそれから予め洗浄されたニトロセルロースフィルタ（ミリポア0.45μ孔サイズ）を介して減圧下で通過され、フィルタは乾燥され、液体シンチレーション計数によってカウントされた。

tatプロテインによる変異体TAR RNAの低減された結合(10、11、12、13、14、15、16、17)

図10ないし図17に示されるグラフは、TAR RNAと様々な変異体TAR RNA配列との間のtat結合に対する競合を例示する。数値データは表2および表3に与えられる。図10および図11において、残基23がUである状態で、位置23、24、25で3つの対になっていない残基を含む領域は、tat結合にとって極めて重要であることが示される。図12、13、14、15、16および図17において、Uの豊富なバルジにすぐ接するステムの塩基対は効率的なtat結合に必要とされることが示され、バルジの一方側での残基22および40での結合対、およびバルジの他方側での塩基対G₂₂-C₄₀に対する要求が存在する。

表2および表3において、様々な変異体TAR RNA配列に対するD_{1/2}値は、変化したTAR RNA配列がCATレポータプラスミドD5-3-3に導入されたトランス活性化実験の結果とともに与えられる。弱く結合するTAR RNA配列は弱いコンペチターであり、D_{1/2}に

対して増大された値を示す。すべての場合に、弱くtatを結合する変異体は効率的にトランス活性化しない。

方法

競合RNAは図7に対する方法で説明されるように転写によって生産された。結合反応物(500u1)は500u1の最終容量中に20nMのTAR RNA、20,000dpm³²P標識したTAR RNA、0.5ugの子ウシ胸腺DNA、0.2ugの酵母tRNA、40ユニットのRNasin(プロメガ)、50mMのトリス-HCl pH 7.5、20mMのKClを含んだ。0から1000nMの様々な濃度で冷たい競合RNAを添加した後、結合は2u1のtatプロテイン(220ug/ml)を添加することによって開始された。結合反応混合物はそれから予め洗浄されたニトロセルロースフィルタ(ミリポア0.45μ孔サイズ)を通して通過され、フィルタ上に保持された放射能は乾燥されたフィルタの液体シンチレーション計数によって検定された。

tatプロテインによる化学的に合成されたRNAの結合(図18および図19)

図18aは本発明者らが上に示した59残基の全長TAR RNAの構造がtatプロテインによって結合されることを示す。ボックス化された残基は特異的な認識において明らかに特に重要であるものである。59-merは上述のように転写によって調製される(図6)。より短いR

NAフラグメントがtatプロテインによって結合され得るかどうかを決定するために、29残基の合成オリゴボヌクレオチド(図18b)は折り畳んでループおよびUの豊富なバルジを含むTARの頂上部分を発生することが可能な配列r(GCCAGAUUUGAGGCCUGGGAGCUCUCUGGC)(29-mer)から化学的に合成された。このオリゴヌクレオチドは市販で入手可能な材料および試薬を使用して、前に述べられたように(102)標準的な固相合成方法によって調製された。2つの他のオリゴボヌクレオチドもまた標準的な方法(102)を使用して化学的に合成された。これらは17-mer r(AGCCAGAUUUGAGCAGC)および14-mer r(GCUGCUUCUCUGGCU)である。アニールされた場合、これらのオリゴボヌクレオチドはtatプロテインに対する既知の認識配列に対応するUの豊富なバルジおよびフランキング塩基対を含むが、頂ループ(103)に欠ける二重鎖RNA(図18c)を形成することが可能である。

図19および表4は59-mer転写物のtatへの結合を化学的に合成された29-merのそれおよび化学的に合成された二重鎖14-mer+17-merのそれと比較するための競合フィルタ結合検定の結果を示す。これらの実験において、均一的に³²P標識した転写物(10nM)は0-300nMの標識していない競合RNAに対

して競合された。その結果は双方の化学的に合成された種(29-merおよび14-mer+17-mer)はtatへの結合については59-merと満足に競合したが、各場合に0.4のK_dを与えるD_{1/2}が2-3倍だけ増大したことを示す。これは化学的に合成されたRNAはtatプロテインに結合可能であり、タンパク質の抑制因子として作用し得ることを示す。

方法

a) 59-mer転写物の調製

これはミリガン(Milligan)他(104)の方法によって本質的に実行された。転写反応物(放射性標識したものについては0.12ml、標識していないものについては0.9ml)は、0.5mMのアニールした合成オリゴヌクレオチド模型およびT7プライマー、40mMのトリスHCl(37°CでpH 8.2)、10mMのMgCl₂、5mMのDTT、1mMのスペルミジン、0.01%のトリトン(Triton)X100、50ug/mlのアセチル化されたBSA(アングリアン・バイオテック(Anglian Biotech))、0.6%のポリエチレングリコール6000(コッチャ・ライト(Roch Light))、各2mMのATP、GTP、CTP、およびUTP、3.3ユニット/mlのRNasin(プロメガ)ならびにT7 RNAポリメラーゼ(10-30ユニット/u1)を含んだ。放射性標識付けのために、100uCiのアルファ³²P

特表平6-500012 (15)

²P-UTPが添加された。反応は37°Cで2時間続くようになり、25mMまでのEDTAの添加によってストップされ、フェノール抽出され、水相はブタノール抽出(1:0.5)によってペレットにとられ、所望の59-merは10%ゲル上のポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製され、その後前のように(1:0.5)0.5Mの酢酸アンモニウム、1mMのEDTA、0.5%のドデシル硫酸ナトリウムおよびブタノール抽出でゲルから溶出された。転写物は1mMのEDTA(pH7.4)中で保存された。

b) オリゴリボヌクレオチドの化学合成

これはアブライド・バイオシステムズ380B DNAシンセサイザーおよび試薬を使用して前述(102)のように本質的に行なわれ、リボヌクレオシドホスホルアミダイト(U、bzA、bzCおよびibG)はミリゲン(Milleges)から得られた。脱保護の後、オリゴリボヌクレオチドは説明されたように(102)イオン交換h.p.1.c.によって、または説明されたように(102)ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製され、滅菌水中で保存された。

c) 細胞結合検定

TK緩衝液(50mMのトリスHCl(0.5M)および22°CでpH7.9)、20mMのKCl)中の競合検定反応物(0.5mI)は、10nM³²P標識した59-mer(約20,000cpm)、40nMのtatプロ

テイン、5ug/mlの子ウシ胎膜DNA、2ug/mlの酵母tRNA、40ユニットのRNasin(プロメガ)および様々な濃度(0-300nM)の標識していない競合RNA(59-mer、29-merまたは予めアニールした(90°Cからゆっくり冷却された)14-merおよび17-mer)を含んだ。結合は氷上で2-15分間起こるようにされ、各反応物は二度予め洗浄された(0.6mlの氷のように冷たいTK緩衝液)ミリポアGSフィルタ(2.5cmディスク、0.22μm孔)を通して通過され、フィルタはTK緩衝液(0.6ml)で洗浄された。乾燥されたフィルタは液体シンチレーションによってカウントされた。結果は添加された競合RNAの濃度に対するフィルタ上に保持されたカウントを示すグラフ(図19)上にプロットされた。

單一のヌクレオシド残基が修飾ヌクレオシドと置換される合成TAR類似体(図20、21、22、23および24)

tatによる認識に直接含まれるTAR上の官能基をさらに規定するために、かつまた修飾されたTAR構造がtatプロテインを結合することが可能であるかどうかを決定するために、TAR類似体は化学的に合成され、そのtat結合特性を修飾されていないTAR RNAと比較された。

図20aはTAR配列におけるU_{2,3}に対応する残基が

2'-デオキシウリジン(dU)か2'-O-メチルウリジン(2'-OMeU)のいずれかによって置換された化学的に合成された29-merの構造を示す。図20bは化学的に合成された14-merオリゴリボヌクレオチドおよび化学的に合成された17-merオリゴリボヌクレオチドから形成されたRNA二重鎖の構造を示し、そこではU_{2,3}、U_{2,4}またはU_{2,5}のいずれかに対応する残基は、2'-デオキシチミジンかまたは5-プロモ-2'-デオキシウリジンかのいずれかによって単独に置換される。

図21および表4は合成29-merのtatへの結合をU_{2,3}で修飾された化学的に合成された29-merのそれと比較するための競合フィルタ結合検定の結果を示す。これらの実験において、³²P-末端標識した29-mer(10nM)は0-120nMの標識していない競合RNAに対して競合された。その結果はdUか2'-OMeUのいずれかを含む双方の化学的に合成された29-merは、tatへの結合に対して修飾されていない29-merと同様に競合したことを示す。これは第残基で修飾を有する化学的に合成されたオリゴリボヌクレオチドはtatプロテインに結合し、tatプロテインの阻害剤として作用し得ることを示す。またU_{2,3}での2'-ヒドロキシル基はtatによる認識に含まれないようであることも明らかである。

図22および表4は17-mer+14-merの合成二重鎖のtatへの結合を、U_{2,3}またはU_{2,4}またはU_{2,5}が2'-デオキシチミジンによって置換された17-mer+14-merの合成二重鎖のそれと比較するための競合フィルタ結合検定の結果を示す。これらの実験において、標識していない14-merにアニールされた³²P-末端標識した17-mer(10nM)は、修飾された17-merおよび修飾されていない14-merから形成された0-120nMの標識していない競合RNAに対して競合された。

図23および24ならびに表4は、17-mer+14-merの合成二重鎖のtatへの結合を、U_{2,3}またはU_{2,4}、またはU_{2,5}が5-プロモ-2'-デオキシウリジンによって置換された修飾17-mer+14-merの合成二重鎖のそれと比較するための競合フィルタ結合検定の結果を示す。これらの実験において、³²P-末端標識した29-mer(10nM)は、修飾された17-merおよび修飾されていない14-merから形成された0-120nMの標識していない競合RNAに対して競合された。

結果は位置23または24での2'-デオキシチミジンによる置換は競合に何の影響も及ぼさなかったが、位置2,5での置換はD_{1,2,3}の2~3分の1の低下を生じたことを示す。また位置24または25での5-プロモ-2'-デオ

特表平6-500012 (16)

キシウリジンによる置換は競合に何の影響も及ぼさなかつたが、位置 2' での置換は D_{1/2} における 2 分の 1 の低下を生じた。これは同時に修飾された糖および塩基残基を含む化学的に合成されたオリゴリボヌクレオチドは tat プロテインを結合可能であり、tat プロテインの阻害剤として作用し得ることを示す。

方法

a) 29-mer または 17-mer の ³²P 末端標識付け

50 u l の標識付け反応物は、約 200-300 p モルの 29-mer または 17-mer、500 p モルの ATP および 40 u C のガンマ-³²P-ATP、50 nM のトリス HCl (pH 7.4)、10 mM の MgCl₂、10 mM の DTT、0.77% のスペルミジンおよび 5 ユニットの T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (NEB) を含み、37°C で 20-30 分間実行された。90°C で 2 分間加熱した後、第 2 の反応がさらに 5 ユニットの T4 ポリヌクレオチドキナーゼを使用して 37°C で 20-30 分間実行された。標識した 29-mer または 17-mer は 15% ゲル (29-mer) または 20% ゲル (17-mer) 上のポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製され、59-mer 転写物に対して上で説明したように溶出され、ブタノール抽出され、1 mM EDTA 中で保存された。

b) 修飾された 29-mer の合成

(102) イオン交換 h. p. I. c. によって精製された。

c) 競合結合検定

TK 細胞液中の競合結合反応物 (0.5 ml) は、³²P-標識したおよび標識していない 29-mer (約 20,000 cpm) から形成された 10 nM の二重鎖、または ³²P-標識したおよび標識していない 14-mer にアニールされた標識していない 17-mer から形成された 10 nM の二重鎖、40 nM の tat プロテイン、5 μg/ml の子ウシ胎盤 DNA、2 μg/ml の酵母 tRNA、および様々な濃度 (0-120 nM) の標識していない競合 RNA (29-mer または修飾された 29-mer (図 21)、または 17-mer + 14-mer 二重鎖または修飾された 17-mer + 14-mer 二重鎖 (22, 23 および 24)) を含み、上述のように実行された。

化学的に合成された修飾された TAR の tat プロテインに対する増強された結合

図 25 は化学的に合成された 15-mer オリゴリボヌクレオチド、および U_{2,3}、U_{2,4} または U_{2,5} のいずれかに対応する残基が 4-チオ-2' - デオキシチミジンによって単に置換される化学的に合成された 18-mer オリゴリボヌクレオチドから形成された RNA 二重鎖の構造を示す。

図 26 および表 4 は 18-mer + 15-mer の合成

適切な位置で 2' - デオキシウリジン (グレン・リサーチ (Glen Research))、または 2' - O-メチルウリジン (グレン・リサーチ) のホスホルアミダイト (phosphoramidite) が結合反応において添加されたことを除いて、各修飾された 29-mer の化学合成は修飾されていない 29-mer について上述したように実行された。精製は前に述べられたように (102) ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって行なわれた。

c) 修飾された 17-mer の合成

適切な位置で 5-プロモ-2' - デオキシウリジン (グレン・リサーチ) のホスホルアミダイトが結合反応において添加されたことを除いて、5-プロモ-2' - デオキシウリジン修飾を行なう 17-mer の化学合成は、修飾されていない 17-mer について上に述べられたように実行された。2' - デオキシチミジン修飾を行なう 17-mer の化学合成は前に述べられた方法 (102) によって実行されたが、フェノキシアセチル (ABN から得られる) によって保護されたグアノシンおよびアデノシンのリボホスホルアミダイトを使用し、かつ適切な位置でチミジンホスホルアミダイト (アブライド・バイオシステムズ) が結合反応において添加された。これらのオリゴヌクレオチドのアンモニア脱保護は、修飾された条件下 (室温で 20-24 時間飽和されたメタノール性アンモニア) 実行された。すべての修飾された 17-mer は前に説明されたように

二重鎖の結合 tat を、U_{2,3} または U_{2,4} または U_{2,5} が 4-チオ-2' - デオキシチミジンによって置換された修飾 18-mer + 15-mer の合成二重鎖のそれと比較するための競合フィルタ結合検定の結果を示す。これらの実験において、標識していない 15-mer にアニールされた ³²P 末端標識した 18-mer (10 nM) は、0-120 nM の標識していない競合 RNA に対して競合された (修飾されていない 18-mer および 15-mer から形成された二重鎖、修飾された 18-mer および修飾されていない 14-mer または 59-mer から形成された二重鎖)。同じ実験において、15-mer および 18-mer 二重鎖は 17-mer および 14-mer (図示せず) と同様に競合した。結果は各場合に 4-チオ-2' - デオキシチミジン置換を含む二重鎖は、修飾されていない 15-mer + 18-mer 二重鎖よりよく競合したこと示す。これは化学的に修飾されたオリゴリボヌクレオチドは修飾されていないオリゴリボヌクレオチドよりも tat に結合可能であり、かつゆえに tat プロテインのよりよい阻害剤として作用し得ることを示す。

方法

a) 4-チオ-2' - デオキシチミジンを含むオリゴリボヌクレオチドの合成

4-チオ-2' - デオキシチミジンを含む 18-mer オリゴリボヌクレオチドは前に説明されたように (102)

特表平6-500012 (17)

合成されたが、リボホスホルアミダイトが以下のとおりであったことを除く、つまりアデノシンおよびシチジンはt-アブチルフェノキシアセチル(Dr. エヌ・シンハ(N. S. Patel)、ミリゲンからの提供)によって、グアノシンはフェノキシアセチル(ABN)によって保護され、かつ4-チオTアミダイト(isotide)は5'-O-ジメトキシリチルS-(p-ニトロフェニル)-4-チオチミジン2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト(106, 107)(Dr. ピィ・コノリー(L. Connolly)、サウサンプトン(Southampton)大学からの提供)であった。このアミダイト(無水アセトニトリル中100mg, 0.75ml)は、合成サイクルにおける適切な点で使用された。アンモニア脱保護が16-24時間室温で水酸化アンモニウム/エタノール(3:1)を使用したことを除いて、合成の終りでのp-ニトロフェニル基および塩基保護基の除去は説明されたように(107)実行された。オリゴヌクレオチドは前に説明されたようにイオン交換h.p.l.c.によって精製され、滅菌水中で保存された。ヘビ毒ホスホジエステラーゼおよびアルカリホスファターゼでの消化によるオリゴヌクレオチドの分析は、5-メチル-2'-デオキシチジンが4-チオT誘導体のアンモニア脱保護の間何も形成されなかったことを示した。

b) 修飾されていない18-merおよび15-mer

TARのtat認識は二重螺旋セグメントおよびG_{2,8}-C_{3,9}塩基対の状況において突出したU残基の存在を必要とする。ワトソン-クリック(Watson-Crick)塩基対合が維持される限り、TARシステム全体の他の塩基対の同一性は、トランス活性化(10, 12, 27)またはtat結合(6, 94)に必要とされるRNA構造への貢献は相対的に小さい。RNAシステムループのバルジ残基を含む配列へのタンパク質の結合は前例がない訳ではない。R17コートタンパク質結合はR17パッケージング配列におけるバルジされたA残基(32)の存在に決定的に依存する。tatのTAR(12nM)に対する解離定数はRNA結合タンパク質に対して典型的である。たとえば、3nMのK_dはRev-RRE複合体(33, 34)および鉄応答エレメントRNAシステムループ(35)に結合する因子の双方に対して測定された。

さらに、バルジ領域はtatを結合するために、またはウィルスLTRをトランス活性化するためにウリジン残基のみを含む必要がない。感染HIV-1クローンで発見されるUCUかUUUかのいずれかのバルジ配列を有するHIV-1 TAR配列は、等価の親和力でtatを結合することが可能であり、これらの配列の双方は効率的にトランス活性化される。生体内データはバルジに関連して、残基U_{2,3}のみがTAR(11)のtat認識にとって重要であることを示す。U_{2,3}のAへの変異はトランス活性化

の生成

これらは上に説明されたように(102)化学的に合成された。

c) 融合結合検定

TK緩衝液中の融合結合反応(0.5ml)は³²P標識した(約20,000cpm)および標識していない15-merにアニールされた標識していない18-merから形成された10nM二重鎖、40nMのtatプロテイン、5ug/mlの子ウシ胸腺DNA、2ug/mlの酵母tRNA、および様々な濃度(0-120nM)の標識していない融合RNA(59-merまたは18-mer+15-mer二重鎖、または修飾された18-mer+15-mer二重鎖、または修飾された18-mer二重鎖)を含み、説明されたように実行された。

結論

tatによって示されたTARの配列特異的認識はHIVトランス活性化におけるtatに対する要求を説明する。HIV-2 LTRの第1のシステムループに由来するTAR RNAはHIV-1 tatを結合することが可能であり、HIV-1 tat(8, 9, 20, 25)によってトランス活性化される。Uの豊富な泡配列を変更するか、またはTARシステムループ構造を崩壊させるTAR RNA変異はtat結合を終らせ、かつまたトランス活性化することができない。

を野生型レベルの18%まで低減することが報告されているが、U_{2,4}のAへの変異およびU_{2,5}のGへの変異はそれぞれ(11)42%および49%だけトランス活性化を低減するだけである。さらに、ここに示されるように、U_{2,4}のCへの変異またはU_{2,5}のCへの変異はトランス活性化およびtat結合にわずかな影響しか及ぼさないが、U_{2,3}のCへの変異はTAR RNAへのtat結合およびトランス活性化を激的に低減する。これはtatはU_{2,3}を認識することを示すが、TARの構造もまた重要であるかもしれない。RNAシステムループ構造において、バルジされた残基はバルジの塩基の数および型ならびにシステム(87)におけるその位置に依存して変化する曲りまたはよじれを導入する。HIV-2 TARの第1のシステムループはU_{2,3}に等価の塩基を含むバルジを有するが、この配列においてバルジは2つのウリジン残基しか含まないので、HIV-1 tatに対するその親和力は2,5分の1に低減される。

tat結合に必要とされないTAR RNAループにおける配列はそれにもかかわらずトランス活性化にとって重要である。バルジかまたはループかいずれかの領域における残基の置換を有するTAR配列は、低減されているが測定可能なトランス活性化を示す。宿主RNA結合タンパク質はループ配列(36, 37)に結合することによってトランス活性化に参加するよう見える。高いプラスミドレ

特表平6-500012 (18)

ベルで観察されるTAR置換変異のいくつかの部分活性化は、tatかまたは宿主タンパク質のいずれかに対するTAR上の弱い結合部位が制限された因子結合を考慮し得ることを示す。Uの豊富なバルジおよびループの双方が変更される二重変異は、単一領域における等価の変異より実質的に低いレベルのトランス活性化を示す。

カオ(Kao)他(38)およびセルビー(Selby)他(12)はtatは抗ターミネータとして間接的に作用し、TAR部位でまたはその近くでの伸張への障害を克服するのを助けることを提案した。そのモデルは短い早期に終結されたRNA転写物がtatのない場合(12, 38, 39)において蓄積するという観察に基づく。このモデルに対する付加的な支持は核追加実験に由来し、その実験はHIV-1転写開始複合体はtat(40)が存在する場合に安定化されることを示し、かつTARは新生鎖(16)上で機能し得る証拠を示す。しかしながら、抗終結はTARそれ自体では発生しそうにない、なぜならトランス活性化を終らせるTARでの変異またはTARの遺伝質欠失は、構造的に高いレベルのTAR発現(5, 12, 19, 27, 28)を結果としてもたらさないし、tat(40)が存在する場合に全長mRNAへ短いRNA転写物を「追跡する」ことは困難であるからである。カオおよびセルビーモデルの修飾されたバージョンは、そこではバクテリオファージ頭部(12)に類似の態様で、TAR部位はRNAポ

リメラーゼ共同因子のための複数部位として機能し、かつより適切であるように思われる。転写を通じて、頭部領域はNタンパク質とともに宿主タンパク質nusAおよびnusBのためのRNA結合部位を生じ、RNAポリメラーゼおよびこれらの共同因子(41, 42)から構成される、遠位のターミネータ(43)での活性を克服することが可能な、転写複合体のアセンブリを可能にする。tat/TAR系において、tatおよび宿主共同因子は新生転写物上に存在するタンパク質結合部位によって媒介される反応においてRNAポリメラーゼと会合することが示される。修飾されたポリメラーゼは様々な遠位部位で伸張に対する障害を克服することによってウイルスmRNA生産を刺激することが可能である。

tatはTAR上の特異的結合部位に対する高い親和力を有するので、生体外でTARへのtat結合に干渉することが可能な化合物は効果的な抗HIV剤であることが証明される可能性が高いことが明らかであろう。

この特許の最初の出願に統いて、合成遺伝子からのTAR RNAの生体内の過発現が結果としてHIV増殖または遺伝子活性化(108, 109)の抑制をもたらし得ることを示す2つの報告があった。TAR RNA配列の過発現はおとりまたは競合抑制因子として作用し、tatプロテインのHIVコード化されたTAR RNA配列への結合を妨げる。結果として、ウイルス性遺伝子発現の活性

化および後代ウィルスの発生はない。

表1
HIV-1 tatのHIV-1 TARへの結合および
変異体TAR配列

	K _d	D _{50%}	K _{rel.}
HIV-1 TAR (UUU)	12 nM	64 nM	1.00
HIV-1 TAR (UCU)	12 nM		
HIV-1 TAR	30 nM	160 nM	0.48
G ₃₃ からC ₂₆ へ	>100 nM	680 nM	0.09
G ₃₃ からC ₂₆ へ : C ₃₇ からG ₁₇ へ	24 nM	76 nM	0.88
デルタU(バルジ)	>70 nM	420 nM	0.15
GからUへ(ループ)	25 nM	56 nM	0.97
UからGへ(バルジ)	>100 nM	420 nM	0.15
アンチセンス	>140 nM	-	-

HIV-1 TARに対する解離定数は図9に示されるスキヤッチャードプロットから計算された。TAR変異株に対する解離定数(K_d)はフィルタ結合検定で観察された半極大結合によって見積られたものであり、これらはHIV-1 TARに対するものほど幾分信頼性がない、なぜならより少ないデータが決定において使用されたからであり、結合条件が常に得られたわけではないからである。変異体配列に対するtat親和力のよりよい測定値はD_{50%}であり、HIV-1 tatのHIV-1 TAR RNAへの結合を50%に低減する競合RNAの濃度である。K_{rel.}はHIV-1 TARおよび競合RNAに対する

特表平6-500012 (19)

$D_{1/2}$ 値の比率である。

表2

TAR RNAへのtat結合に対する、および生体内のトランスクレオチド置換の影響

1. Uの豊富なバルジにおける変異

変異	$D_{1/2}$ (nM)	ユニットCAT	
		活性/ 500ug プラスミド	活性/ 14,400
-	-	-	-
<u>野性型: UUU, UCU</u>	<u>90</u>	<u>14,400</u>	
-	-	-	-
UUC	80	10,800	
UCC	100	8,400	
UU	100	4,200	
U	673	1,420	
-	-	-	-
CUU	630	1,250	
CCU	1,330	1,850	
CCC	1,778	840	
CUC	2,137	430	
CC	2,372	1,100	
-	-	-	-

表4

二重鎖	$D_{1/2}$ (nM)	K_{rel} (59-mer)	K_{rel} (29-mer 14+17)
59-mer	40	1.0	
29-mer	100	0.4	
14+17	110	0.4	
29-mer	60		1.0
40-23	65		1.1
2'-OMeU-23	50		1.2
14+17	40		1.0
4T-23	15		1.1
dT-24	30		1.2
4T-25	80		0.4
BrdU-23	70		0.6
BrdU-24	45		1.0
BrdU-25	35		1.1
15+18	65	0.8	1.1
14+17	50	1.4	1.0
59-mer	18	1.0	2.1
4-チオT-23	32	1.6	1.6
4-チオT-24	25	1.7	2.0
4-チオT-25	12	1.5	1.2

表4 : $D_{1/2}$ (tatが存在する場合の ^{32}P RNAの

TAR RNAへのtat結合に対する、および生体内ト

ランスクレオチド置換の影響

I. I. Uの豊富なバルジを取囲むシステムにおける変異

変異	$D_{1/2}$ (nM)	ユニットCAT 500ug プラスミド
野性型:	90	5,600
A22からG22へ	63	5,000
U40からA40へ	5,623	760
A22からU22へ; U40からA40へ	220	4,150
C89からG39へ	1,496	80
G26からC26へ; C39からG39へ	2,371	13
G26からA26へ; C39からU39へ	631	290

フィルタへの結合を半分に低減するために必要とされる競合RNAの濃度)、および軽写59-merまたは化学的に合成された29-merもしくは14+17二重鎖と比較される様々な化学的に合成されたRNAに対する K_{rel} ($D_{1/2}$ の相対値)。 $D_{1/2}$ のすべての値は競合曲線から見積られ、20%のずれを受ける。下線は ^{32}P RNAの同一性を示す。

特表平6-500012 (20)

引用文献

1. デイトン, エイ・アイ、ソドロスキ, ジェイ・ジー、ローゼン, シー・エイ、ゴウ, ダブリュー・シー、&ヘイゼルティン, ダブリュー・エイ, Cell 44, 941-947 (1986)。 (ヒトT細胞リンパ刺激ウィルス型1のトランスアクチベータ遺伝子は反復のために必要とされる)。
2. ローゼン, シー・エイ、ソドロスキ, ジェイ・ジー、ゴウ, ダブリュー・シー、デイトン, エイ・アイ、ロブケ, ジェイ、&ヘイゼルティン, ダブリュー・エイ, Nature 319, 555-559 (1986)。
3. フィッシャー, エイ・ジー、ファインバーグ, エム・ビー、ジョセフス, エス・エフ、ハーバー, エム・イー、マーセル, エル・エム、レイズ, ジー、ゴンダ, エム・エイ、アルドビニ, エイ、デバック, シー、ガロ, アール・シー、&ウォンダースタール, エフ, Nature 320, 367-371 (1986)。 (HTLV-1のトランスアクチベータ遺伝子はウィルス反復に重要である)。
4. ハウバー, ジェイ、パークス, エイ、ハイマー, イー・ビー、&カリン, ピー・アール, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6364-6368 (1987)。
5. ミューシング, エム・エイ、スマス, ディ・エイチ、&ケイパン, ディ・ジェイ, Cell 48, 691-701 (1987)。ヒト免疫不全ウィルストラヌスアクチ

- ベータタンパク質によるmRNA蓄積の調節)。
6. ディングウォール, シイ、アーンベルグ, エイ、ゲイト, エム・ジェイ、グリーン, エス・エム、ヒーフィー, エス、カーン, ジェイ、ロウ, エイ・ディ、シング, エム・スキナー, エム・エイ、&バレリオ, アール, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 6925-6929 (1989)。 (ヒト免疫不全ウィルスtatプロテインは生体外でトランス活性化応答領域(TAR) RNAを結合する)。
7. ミューテー, ダブリュー・イー・ジー、オカモト, テイ、ロイター, ピィ、ウガルコビック, ディ、&シュローダー, エイチ・シイ、J. Biol. Chem. 265, 3803-3808 (1990)。
8. ギアダー, エム、エマーマン, エム、ソニゴ, ピィ、クラベル, エフ、モタングニア, エル、&アリゾン, エム, Nature 326, 662-669 (1987)。 (ヒト免疫不全ウィルス型2のゲノム構成およびトランス活性化)。
9. エマーマン, エム、ギアダー, エム、モンタグニア, エル、バルチモア, ディ、&ミューシング, エム・エイ, EMBO J. 6, 3755-3760 (1987)。 (ヒト免疫不全ウィルス型2トランスアクチベータの特異性はヒト免疫不全ウィルス型1のそれとは異なる)。
10. ロイ, エス、パークス, エタ・ティ、ローゼン, シー・エイ、イトピッチャ, ジェイ、&ソネンベルグ, エタ、

J. Virol. 64, 1402-1406 (1990)。
(tatによるヒト免疫不全ウィルス型1LTR定方向遺伝子発現のトランス活性化のための構造的要件: tat応答配列における塩基対、ループ配列およびバルジ的重要性)

11. パークハウト, ピィ&ジーング, ケイーティ、J. Virol. 63, 5501-5504 (1989)。
(ヒト免疫不全ウィルス型1のトランス活性化は、トランス作用応答ヘアピンの一本鎖バルジおよびループの双方に配列特異的である: 定量分析)。

12. セルビー, エム・ジェイ、ペイン, イー・エス、ルーシュ, ピィ、&ピーターリン, ピィ・エム, Genes Dev. 3, 547-558 (1989)。 (tatのステムループの構造、配列および位置は、HIV-1LTRを介するtatによる転写的伸張を決定する)。

12. ハウバー, ジェイ&カリン, ピィ・アール, J. Virol. 62, 673-678 (1988)。 (ヒト免疫不全ウィルス型1LTRのトランス活性化応答領域の変異分析)。

14. ジャコボビッツ, エイ、スマス, ディ・エイチ、ジャコボビッツ, イー、ピィ&ケイパン, ディ・ジェイ、Mol. Cell Biol. 8, 2555-2561 (1988)。
(ヒト免疫不全ウィルス1(HIV-1)およびHIV-2 mRNA開始部位の離散元素3'は、HIVトランス

アクチベータによる転写的活性化を媒介する)。

15. ピーターリン, ピィ・エム、ルーシュ, ピィ・エイ、バール, ピー・ジェイ、&ウォーカー, エム・ディ, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 9734-9738 (1986)。
16. パークハウト, ピィ、シルバーマン, アール・エイチ&ジーング, ケイーティ, Cell 59, 273-282 (1989)。 (tatは新生RNA標的を介してヒト免疫不全ウィルスをトランス活性化する)。
17. シャープ, ピィ・エイ&マルシニアク, アール・エイ、Cell 59, 229-230 (1989)。
18. ジャコボビッツ, エイ、ローゼンタール, エイ&ケイパン, ディ・ジェイ, EMBO J. 9, 1165-1170 (1990)。
19. カリン, ピィ・アール, Cell 46, 973-982 (1986)。
20. パークハウト, ピィ、ガティグノル, エイ、シルバー, ジェイ、&ジーング, ケイーティ, Mol. Cell. Biol. 1, 18, 1839-1846 (1990)。
21. パークス, エタ・ティ、コーベン, イー・エイ、ダービュー, エイ、ローゼン, シイ、ヘーゼルティン, ダブリュー&ソネンベルグ, エタ, EMBO J. 7, 2831-2837 (1988)。
22. エグリー, アイ、パトリシン, アール、&ソネンベ

特表平6-500012 (21)

- ルグ, エヌ、Cell 56, 303-312 (1988)。
 23. ライス, エイ・ビー、&マシューズ, エム・ビィ、
Nature 332, 551-553 (1988)。
 24. ブラドック, エム、チャンバース, エイ、ウィルソン,
 ダブリュー、エスノーフ, エム・ビー、アトムズ, エ
 ス・イー、キングスマン, エイ・ジェイ、&キングスマン,
 エス・エム、Cell 58, 269-279 (1989)。
 25. フェンリック, アール、マリム, エム・エイチ、ハ
 ウバー, ジェイ、リー, エス-ワイ、メイゼル, ジェイ&
 カリン, ピー・アール、J. Viro., 63, 5006-50
 12 (1989)。
 26. モリス, シィ・イー、クレメント, ジェイ・エフ&
 マクアリスト, ダブリュー・ティ、*Gene* 41, 192-
 200 (1988)。
 27. フェング, エス&ホランド, イー・シィ、*Nature*
 334, 165-168 (1988)。(*HIV-1 tat*トランスクレッジ活性化はTAR内のループ配列を必要とする)。
 28. ガルシア, ジェイ・エイ、ハリック, ディ、ソルタ
 ナキス, イー、ウー, エフ、ミツヤス, アール&ゲイナー,
 アール・ビィ、EMBO J. 8, 765-778 (19
 89)。(転写的調節に必要とされるヒト免疫不全ウィル
 ス型1LTR TATAおよびTAR領域配列)。
 29. アダチ, エイ、ゲンデルマン, エイチ・イー、ケイ
 ニーク, エス、フォルクス, ティ、ウィリー, アール、ラ
 ニー, ワイ、*Natl. Acad. Res.* 86, 1819-1825
 (1990)。
 30. ゲイナー, アール、ソルタナキス, イー、クワバラ,
 エム、ガルシア, ジェイ、&シグマン, ディ・エス、*Proc.
 Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 4858-4862
 (1989)。
 31. ガティグノル, エイ、クマール, エイ、ラブソン,
 エイ、&ジーング, ケイーティ、*Proc. Natl. Acad. Sci.
 U.S.A.* 86, 7828-7832 (1989)。
 32. カオ, エス・ワイ、カルマン, エイ・エフ、ルーシ
 ュ, ピー・エイ、&ピーターリン, ピィ・エム、*Nature*
 330, 489-493 (1987)。(*tat*遺伝子生
 産物によるHIV-1のLTR内の転写の抗終結)。
 33. トゥーヒー, エム・ジィ、&ジョーンズ, ケイ・エ
 イ、*Genes Dev.* 3, 265-283 (1989)。
 34. ラスピア, エム・エフ、ライス, エイ・ビィ、&マ
 シューズ, エム、ビィ、Cell 59, 283-292 (1
 989)。(*HIV-1 tat*プロテインは転写的開始
 を増大し、伸張を安定化させる)。
 35. バリク, エス、ゴッシュ, ピー、ウェイレン, ダブ
 リュー、ラジンスキ, ディ、&ダス, エイ、Cell 50,
 885-899 (1987)。
 36. ラジンスキ, ディ、グラザドジエルスカ, イー、&
 ダス, エイ、Cell 59, 207-218 (1989)。
 プソン, エイ&マーティン, エム・イー、J. Viro., 59,
 284-291 (1986)。
 37. ゴーマン, シィ・エム、パドマナブリアム, アール
 &ホワード, ピー・エイチ、*Science* 222, 551-5
 53 (1983)。
 38. ゴーマン, シィ・エム、モファット, エル・エフ&
 ホワード, ピー・エイチ、*Nat. Cell Biol.* 2, 1044
 -1051 (1982)。
 39. ウー, エイチ・エヌ&ウーレンベック, オー・シ
 ー、*Biochemistry*, 26, 8221-8227 (198
 7)。
 40. ヒーフィ, エス、ディングウォール, シィ、アーン
 ベルグ, アイ、ゲイト, エム・ジェイ、グリーン, エス・
 エム、カーン, ジェイ、ロウ, エイ・ディ、シング, エム
 およびスキナー, エム、Cell 60, 685-693 (1
 990)。(*ウイルス粒子発現 (rev) タンパク質のH
 IV-1 細胞遺伝子は、rev応答元素領域内に置かれた
 RNAステムループ構造に結合する)。
 41. デイリー, ティ・ジェイ・クラク, ケイ・エス、ゲ
 アリー, ジィ・エス、メイワン, ティ・イー&ルッシェ,
 ジェイ・アール、*Nature*, 342, 816-819 (19
 89)。(生体外でのHIV-1組換えrevタンパク質
 のrev応答元素への特異的結合)。
 42. レイボルド, イー・エイ、ラウンダノ, エイ、&*

43. ゴッテスマン, エム・イー、アドヒア, エス、&ダ
 ズ, エイ、J. Mol. Biol. 140, 57-75 (1980)。
44. アグラワル, エス、グッドチャイルド, ジェイ・シ
 ピエラ, エム・ビー、ソーントン, エイ・エイチ、サリン,
 ピィ・エス、およびザメクニック, ピィ・シィ (1988)
 、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7079-70
 83。
45. ブリル, ダブリュー・ケイーディ、タング, ジェイ
 一ワイ、マー、ワイエックスおよびケラザス, エム・エ
 イチ (1989)、*J. Am. Chem. Soc.*, 111, 232
 1-2322。
46. チャーング, ティ・エイおよびシャープ, ピー・エ
 イ (1989) *Cell* 59, 789-795。(*HIV
 rev*による調節はスプライス部位の認識に依存する)。
47. コーラン, エイ・ダブリュー、チエン, シィーエイ
 チおよびローゼン, シィ・エイ (1990)、*Proc. Nat
 l. Acad. Sci. (USA)* 87, 1198-1202。(*en
 v* mRNAにおける構造化された領域を有するヒト免疫
 不全ウィルス*rev*タンパク質の特異的相互作用)。
48. コノンリー, ピィ・エイ、およびニューマン, ピー
 ・シー、(1989) *Nucleic Acids Res.*, 17, 495
 7-4974。
49. コスティック, アールおよびバイル, ジェイ・エス

特表平6-500012 (22)

- (1989) (*Tetrahedron Letters*)、30、4693-4696。
50. カリン, ビィ・アール、フーバー, ジェイ、ケンブル, ケイ、ソドロスキ, ジェイ・ジイ、ハイゼルティン, ダブリュー・エイおよびローゼン, シィ・エイ (1988)、*J. Virol.* 62、2498-2501 (ヒト免疫不全ウイルストラス作用 *art* 遺伝子生産物の遺伝子構造)。
51. デイトン, イー・ティ、パウエル, ティ・エム、およびデイトン, エイ・アイ (1989)、*Science* 246、1625-1629。 (CAR、HIV-1のrevタンパク質のための標的配列の機能分析)。
52. エマーマン, エム、バゾウ, アールおよびビーデン, ケイ (1989)、*Cell* 57、1155-1165。 (ヒト免疫不全ウイルスのrev遺伝子生産物はエンベロープ特異的RNA局在化に影響を及ぼす)。
53. ファインベルグ, エム・ビィ、ジャレット, アール・エフ、アルドビニ, エイ、ガロ, アール・シイおよびウォングースタール, エフ (1986)、*Cell* 46、807-817。 (HTLV-1の発現および生産はウイルスRNAのスプライシングおよび翻訳のレベルでの複合体調節を含む)。
54. フェルバー, ビィ・ケイ、ハドゾボウロウークラダラス, エム、クラダラス, シィ、コウブランド, ティおよびパブラキス, ジィ・エタ (1989)。 *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86、1837-1840 (HIVのart/trsタンパク質の発現およびウイルスエンベロープ合成におけるその役割の研究)。
61. ラッグ, エイ、オレッチスカヤ, ティ・エス、ボルコフ, イー・エム、チェックス, ティ、シャバロワ, ゼット・エイおよびローゼンタール, エイ (1989) *Nucleosides and Nucleotides* 8、1473-1483。
62. ルメートル, エム、ペイヤード, ピーおよびルブルー, ピー (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84、648-652。
63. レッテンガー, アール・エル、ザング, ジー・サン, ティ・ケイ、イケウチ, ティおよびサリン, ピイ (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86、6553-6556。
64. マック, エムおよびエンゲルス, ジェイ・ダブリュー (1988) *Nucleic Acids Res.* 16、3525-3543。
65. マリム, エム・エイチ、ホーバー, ジェイ、リ, エス・ーウイ、メーゼル, ジェイ・ブイおよびカリン, ピー・アール (1989a) *Bioct* (ロンドン) 338、254-257。 (HIV-1 revトランスクレベータは構成された標的配列を介してスプライシングされないウイルスマRNAの核移出を活性化するように作用する)。
66. マリム, エム・エイチ、ボーンライン, エス、フェンリック, アール・リ, エス・ーウイ、メーゼル, ジェイ・ブイおよびカリン, ピー・アール (1989b) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86、8222-8226。 (異なる靈長類免疫不全ウイルス種によってコードされたrevトランスクレベータの機能的比較)。
67. マリム, エム・エイチ、ボーンライン, エス、ホーバー, ジェイおよびカリン, ピー・アール (1989c) *Cell* 58、205-214。 (HIV-1 revトランスクレベータの機能的解剖: rev機能のトランス優勢抑制因子の調導)。
68. マリム, エム・エイチ、ティリー, エル・エス、マッカーン, ティ・エフ、ルッシュ, ジェイ・アール、ホーバー, ジェイおよびカリン, ピー・アール (1990) *Cell* 60、675-683。 (HIV-1構造的遺伝子発現はそのRNA標的配列へのrevトランスクレベータの結合を必要とする)。
69. ミラー, ピィ・エス、ドレオン, エタ、バルフォード, エス・エムおよびマクバーランド, ケイ・ピー (1980) *J. Biol. Chem.* 255、9569-9665。
70. ミラー, ピィ・エス、チャンドラーセイギヤラン, エス、ドウ, ティ・エル、バルフォード, エス・エムおよびキム, エル・エス (1982) バイオケミストリ (Biochemistry) 21、5468-5474。

特表平6-500012 (23)

71. ミラー, ピィ・エス、ブレーク, ケイ・アール、クッシュマン, シー・ディ、キーン, ジェイ・エム、リー, ピー・エル、リン, エス-ビー、およびムラカミ, エイ (1988) *Nucleic Acids Res. Special Pub. No. 20*, 113-114.
72. モーパン, エフ・レイナー, ピー・インパック, ジェイ・エル、テネット・エス、パートランド, ジェイ・アール、バオレッティ, ジェイ、マルビー, シーおよびバオレッティ, シー (1987) *Nucleic Acids Res.*, 15, 3421-3437.
73. オルセン, エイチ・エス、ネルブラック, ピィ、コレイン, エイ・ダブリュー、ローゼン, シー・エイ (1990) *Science*, 247, 845-848. (二次構造は HIV revタンパク質の RNA との相互作用の主要な決定因子である)。
74. ベローワルト, エル、アースライン, ユー、リベイユ, シー、デュオング, エタ・ティ、ビサーニ, イー、ジョバナンジェリ, シー、ル・ドアン, ティおよびヘレン, シー (1990) *Nature*, 344, 368-360.
75. ピッツィリーリ, ジェイ・エイ、クラウチ, ティ、モロニー, エス・イーおよびペナー, エス・エイ (1990) *Nature*, 343, 38-37.
76. リムスキー, エル、ホーバー, ジェイ、デュコピッチ, エム、マリム, エム・エイチ、ラングルワ, エイ、カ
- リン, ピー・アールおよびグリーン, ダブリュー・シー (1988) *Nature* (ロンドン) 335, 738-740. (HIV-1 revタンパク質の HTLV-1 rex タンパク質による機能的置換)。
77. ローゼン, シー・アール、ターウィリングガード, イー、デイトン, エイ・アイ、ソドロウスキー, ジェイ・ジーおよびハイゼルティン, ダブリュー・エイ (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85, 2071-2075. (ヒト免疫不全ウィルスの遺伝子内シス作用性応答性配列)
78. サディエ, エム・アール、ベンター, ティおよびウォンースタール, エフ (1988) *Science* 239, 910-913. (HIV-1 の 2 つのトランス調節遺伝子 (*tat*-III, *trs*) の部位特異的突然変異誘発)。
79. ソドロウスキー, ジェイ・ゴー、ダブリュー・シー、ローゼン, シー・エイ、デイトン, エイ、ターウィリングガード, イーおよびハイゼルティン, ダブリュー・エイ (1988) *Nature* (ロンドン) 321, 412-417 (HTLV-III 複製に必要とされる第 2 の転写後のアクチベータ遺伝子)。
80. スプロート, ピー・エス、レイモンド, エイ・アイ、ペイジャー, ピー、ニューナー, ピーおよびライダー, ユー (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17, 3373-3386.
81. スタイン, シー・エイ、スパンゲ, シー、シノツカ, ケイおよびコーベン, ジェイ・エス (1988) *Nucleic Acids Res.*, 15, 3209-3221.
82. サン, ジェイ-エス、フランソワ, ジェイ-ジー、レイパリ, アール、セゾン-ペイモアラ, ティ、モンテネーラガレスティア, ティ、デュオング, エタ・ティおよびヘレン, シー (1988) バイオケミストリ (Biochemistry), 27, 6039-6045.
83. ブラッソフ, ブイ・ブイ、ゲイダマコフ, エス・エイ、ザリトバ, ブイ・エフ、クノール, ティ・ジー、ルビナ, エイ・エス、ニコナバ, エイ・エイ、ボダスト, エル・エムおよびフェドロバ, オー・エス (1988) *Gen.*, 72, 313-322.
84. ザップ, エム・エルおよびグリーン, エム・アール (1989) *Nature* (ロンドン) 342, 714-716. (HIV-1 revタンパク質による配列特異的結合)。
85. イケハラ, エム、オオツカ, イー、トクンガ, ティ、タニヤマ, ウイ、イワイ, エス、キタノ, ケイ、ミヤモト, ティ、オウギ, ティ、サクラガワ, ウイ、フジヤマ, ケイ、イカリ, ティ、コバヤシ, エム、ミヤケ, ティ、シバハラ, エス、オノ, エス、ウエダ, ティ、タナカ, ティ、ババ, エイチ、ミキ, エイチ、サクライ, エイ、オオイシ, ティ、チサカ, オーおよびマツバラ, ケイ (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5956-5960.
86. スミシーズ, オー (1985) *Science*, 150, 1595-1598.
87. パックチャリヤ, エイ、マーク, エイ・アイ・エイチ、およびリリー, ディ・エム (1990) *Nature*, 343, 484-487.
88. セルピー エムジー、ペイン イーエス、ルシュー ピー、ピーターリン ピーエム。TAR におけるステムループの構造、配列および位置は HIV-1 LTR によって *tat* による転写伸長を決定する。 *Genes & Dev.* 1989, 3: 547-558.
89. ラスピア エムエフ、ライス エイピー、マシューズ エムピー。HIV-1 *tat* およびアデノウィルス E1a の間の相乗作用は主に転写伸長の安定化による。ジーンズ・アンド・ディベロップメント (*Genes & Development*) 1990, 4: 2397-2408.
90. ブラッドック エム、ソーバーン エイエム、チャンバ エイ、エリオット ジーディ、アンダーソン ジージェイ、キングスマン エイジェイ、キングスマン エスエム。HIV-1 U3 領域によって課された各認証遮断は *tat*-TAR 相互作用によってリリーフされる。 *Cell* 1990, 62: 1123-1133.
91. チン ディジェイ、セルピー エムジェイ、ピーターリン ピーエム。ヒト免疫不全ウィルス型 I *tat* は最もしくは細胞質または葉状細胞において成熟したトラン

特表平6-500012 (24)

- ス作用性応答領域RNA種をトランス活性化しない。J. Virology 1991, 65: 1758-1764。

92. ロイ エス、エイジー エム、ホバネシアン エイジー、ゾーネンバーグ エヌ、カツツェ エムジー。ヒト免疫不全ウィルス型1 tat 応答性構造RNAのステム構造の完全性はインターフェロン誘導された68,000-M4プロティンキナーゼとの相互作用に必要とされる。J. Virology 1991, 65: 632-640。

93. ガネリー エス、ライス エイピー、ロバートソン エイチディ、マシューズ エムピー。HIV-1 TAR RNAはプロティンキナーゼDAIの活性化を防ぐことができる。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87: 8686-8691。

94. ディングウォール シー、エルンバーグ アイ、ゲイト エムジェイ、グリーン エスエム、ヒーフィ エス、カーン ジェイ、ローベ エイディ、シン エム、スキナ エムエイ。HIV-1 tatタンパク質はTAR RNA構造のステムにおいてUの豊富なバルジへの結合によって転写を刺激する。EMBO J. 1990, 9: 4145-4153。

95. コーディングリー エムジー、ラフェミア アールエル、キャラハン ピーエル、コンドラー ジェイエイチ、サルダナ ブイブイ、グラハム ディジェイ、ニュイアン ティエム、ルグローク ケイ、ゴットリップ エル、シュラバック エイジェイ、コロンノ アールジェイ。生体外のHIV-1のTAR配列とのtatおよびtatペプチドの配列特異的相互作用。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87: 8985-8989。

96. ウィークス ケイエム、アンペ シー、シュルツ エスシー、スタイル ティエイ、クローザーズ ティエム。HIV-1 tatタンパク質のフラグメントはTAR RNAを特異的に結合する。Science 1990, 249: 1282-1285。

97. サウスゲート シー、ザップ エムエル、グリーン エムアール。不完全な84ヘつながれたHIV-1 tatタンパク質による転写の活性化。ザップ、エム・エルおよびグリーン、エム・アール(1989) Nature (ロンドン) 342、714-716。(HIV-1 revタンパク質による配列特異的結合)。

別のタンパク質を介するRNA。Nature 1990, 345: 640-642。

98. セルビー エムジェイ、ピーターリン ピーエム。異種RNA結合タンパク質を介するHIV-1 tatによるトランス活性化。Cell 1990, 62: 769-776。

99. パークハウト ピー、ガティニョール エイ、ラブソン エイピー、ジーング ケイーティ。HIV-1 LTRのTAR-独立的活性化: tatがプロモータの特定

領域を必要とする証拠。Call 1990; 62:757-
767。

100. オカモト ティ、ベンター ティ、ジョセフス
エスジー、サディエ ジュイアール、ウォンースタール
エフ。生体外のヒト免疫不全ウィルスのLTRからの転写
活性化。*Virology* 1990, 177: 606-614。

101. マーシニャック アールエイ、カルナン ピージ
エイ、フランケル エイディ、シャーブ ピーエイ。HIV
V-1 tatタンパク質は生体外における転写をトラン
ス活性化する。*Cell* 1990, 63: 791-802。

102. 「オリゴヌクレオチドおよびそれらの類似体：実
用的アプローチ」におけるゲート、エムジェイ、ブリッヂ
ャード、シーおよびスリム、ジー（1991）、エフ・エ
ックスタイン（ed.）、オックスフォード・ユニバーシテ
ィ・プレス（Oxford University Press）、25-48。

103. サムナースミス、エム、ロイ、エス、バーネット
ト、アール・ダブリュー、クーパーマン・アール、ライド
エル・エスおよびソーネンバーグ・エヌ（1991）アブ
ストラクツ・オブ・IUB・カンファレンス・オン・ヌク
レオイック・アシッズ・セラビューティックス（Abstracts
of IUB Conference on Nucleic Acid Therapeutics）、
1991年1月13-17日、クリアウォーター・ビーチ、
フロリダ、p 94。.

104. ミリガン、ジェイ・エフ、グローブ、ディ・ア-

ル、ウィザレル、ジー・ダブリュー、およびユーランベック、オー・シー (1987) Nucleic Acids Res., 15, 8784-8799。

105. カーター、ジーおよびブルーノル、シー (1990) Nucleic Acids Res., 18, 201。

106. ニコホロフ、ティ・ティ、コネリー、ビー・エイ (1991) Tetrahedron Lett., 32, 2505-2508。

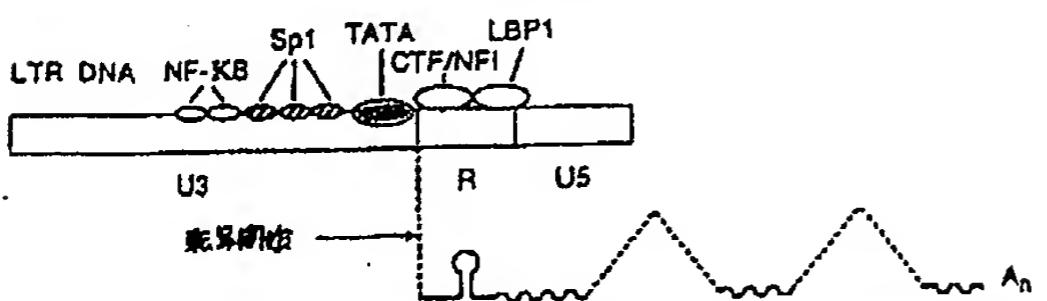
107. ニコホロフ、ティ・ティ、コネリー、ビー・エイ (1991) Tetrahedron Lett., 印刷中。

108. サリンジャー、ビー・エイ、ガラルド、エイチ・エフ、ウンガース、ジー・イーおよびギルボア、イー (1990) Cell 63, 601-608。

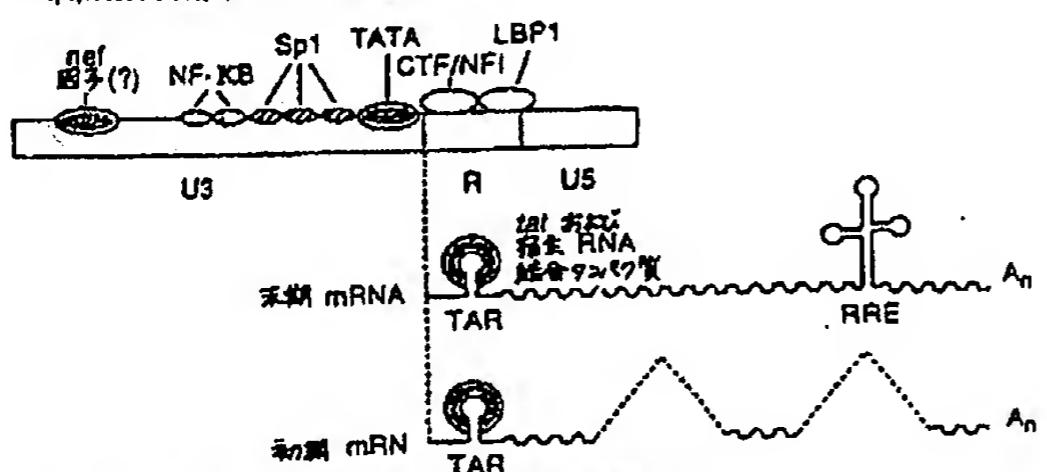
109. グラハム、ジー・ジェイ、マイヨ、ジェイ・ジェイ (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5817-5821。

110. ディングウォール シー、エルンバーグ アイ、ゲイト エムジェイ、ヒーフィー エス、カーン ジェイ、およびスキナー エム。トランス活性化は TAR RNA への HIV-1 tatタンパク質の結合を必要とする。アドバンシズ・フォー・AIDS (Advances for AIDS), 1991, 133-143。

1. 転写因子のLTRへの結合以、初期mRNAの発生しLIL転写を誘起する。



2. tat LILが上昇し、転写を刺激する。初期mRNAは核から移出され、翻訳され、早期mRNAが核内に保持される。



3. rev LILが上昇し、核からの初期mRNAの移出を刺激する。

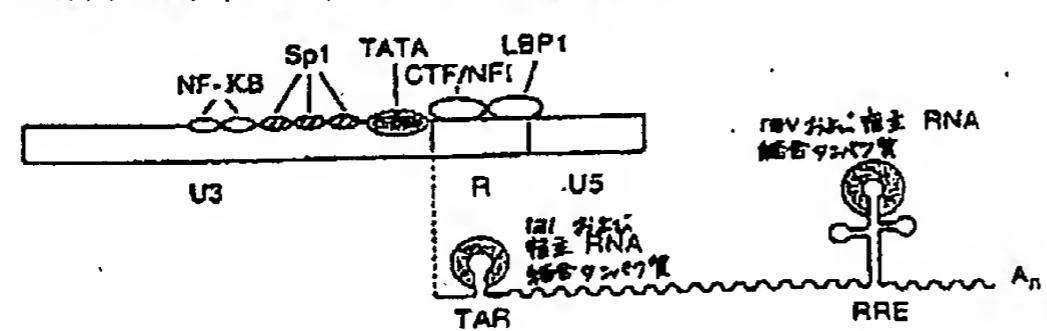


Fig. 1

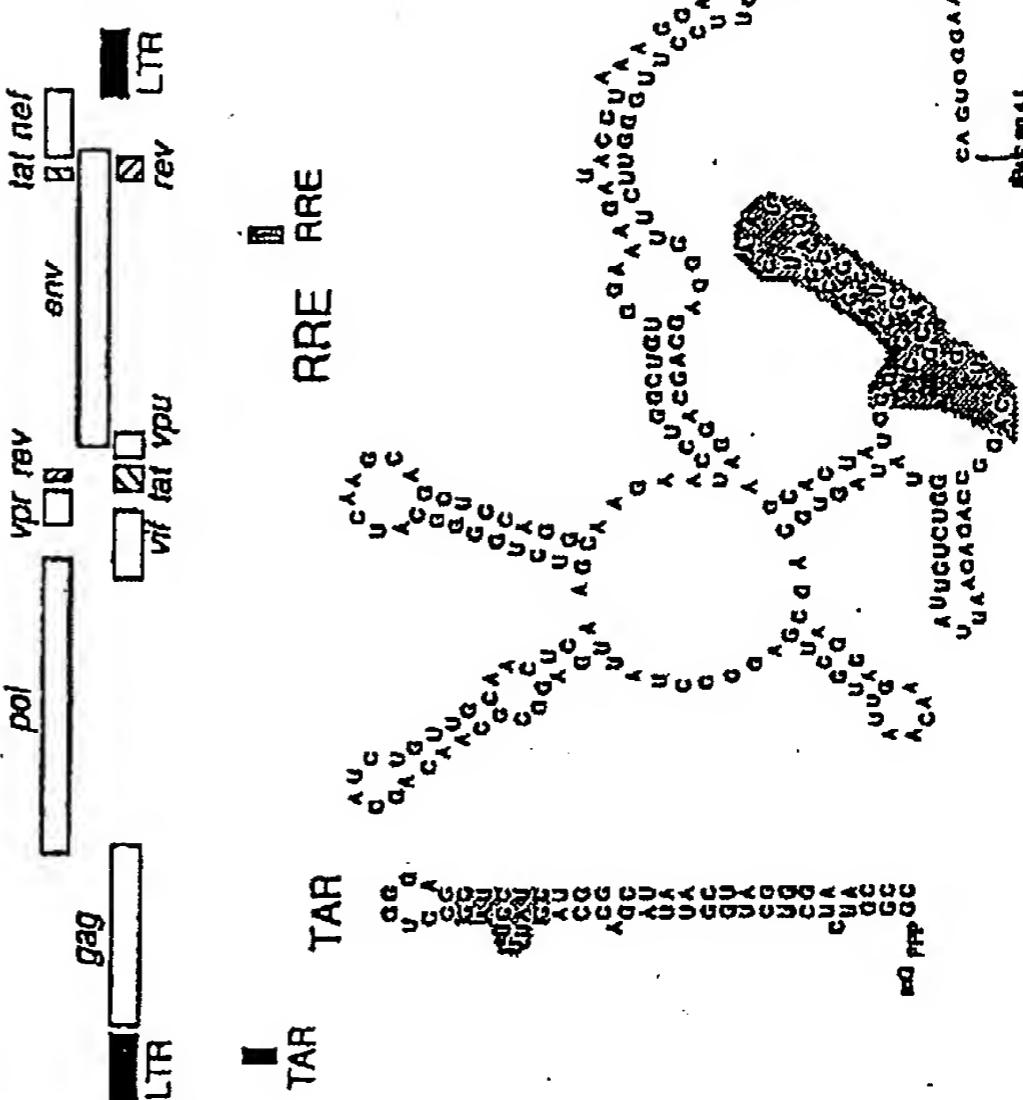


Fig. 2

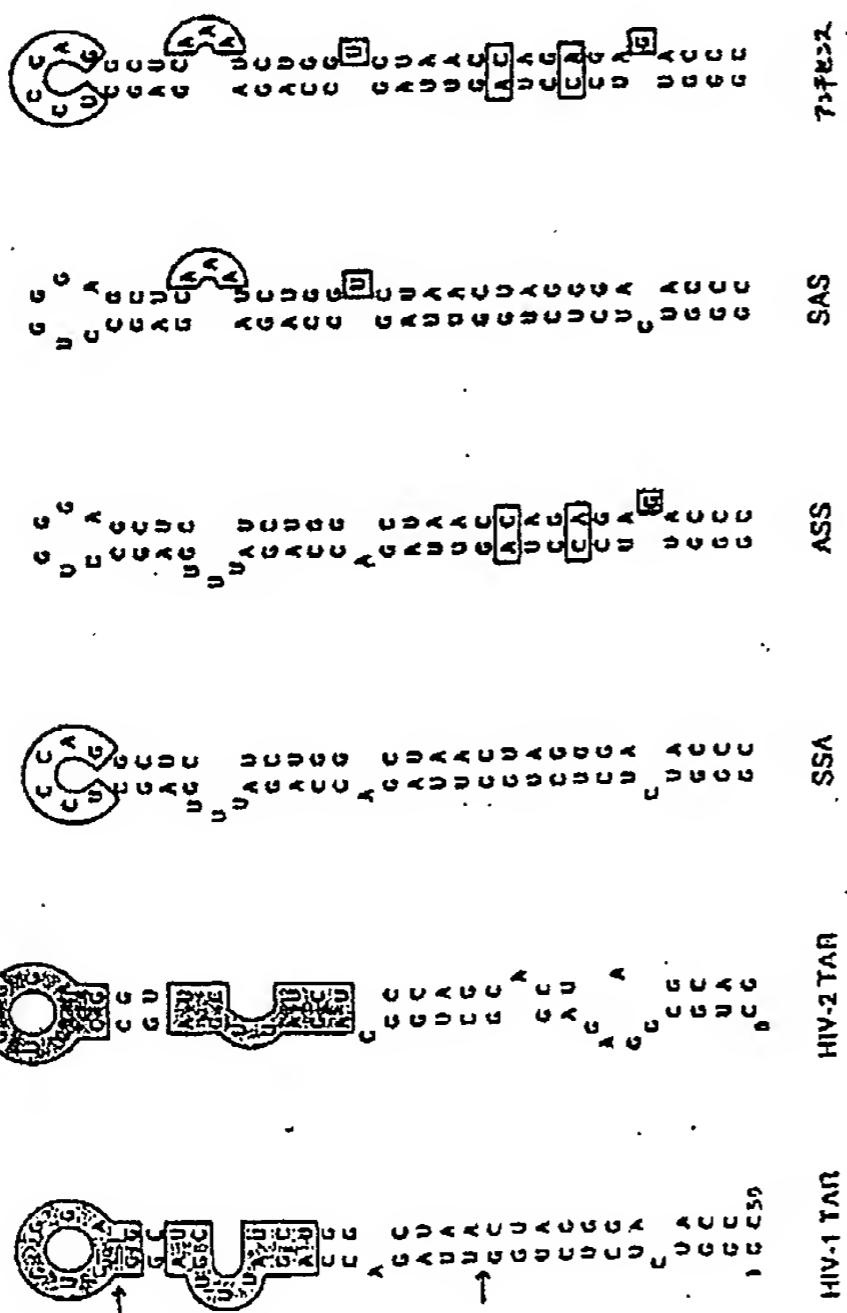


Fig. 3 Sheet 1

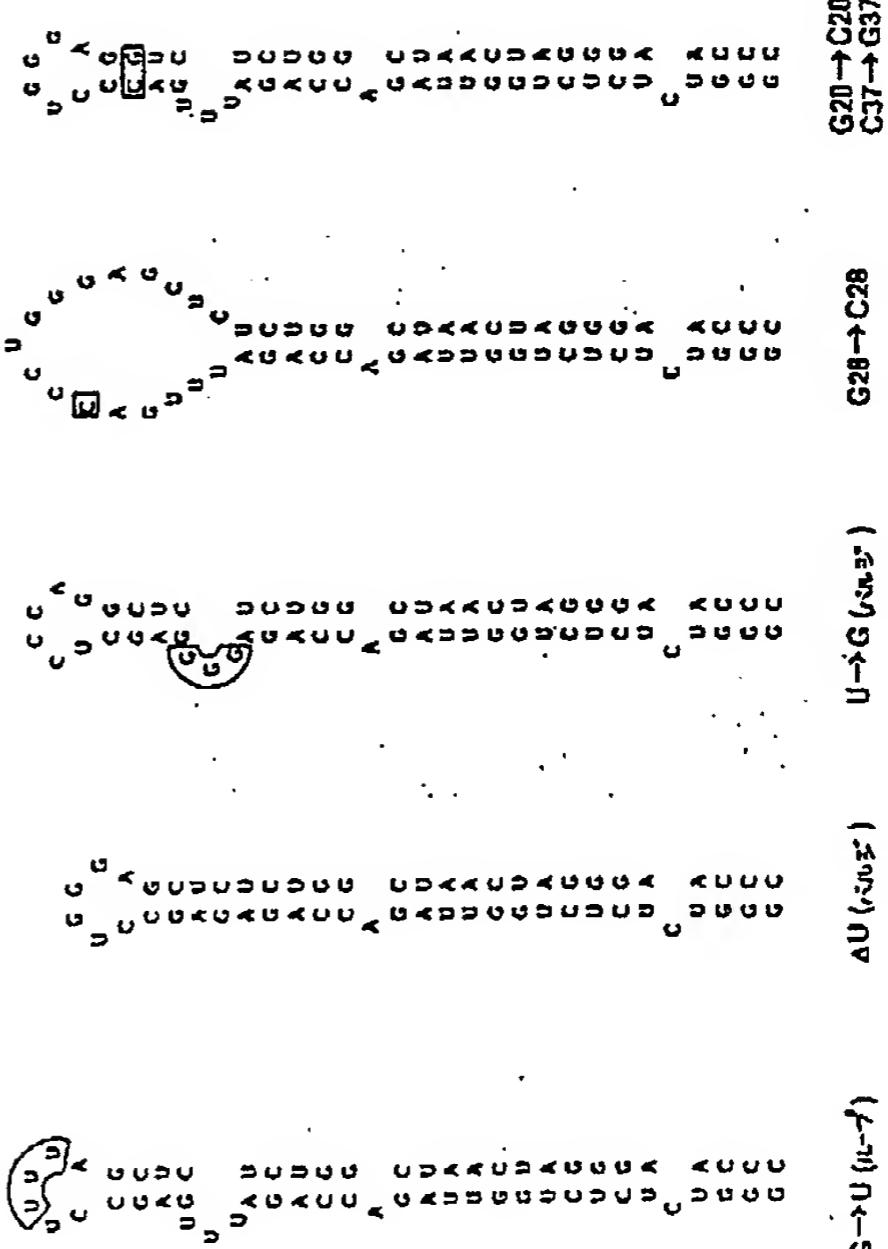


Fig. 3 Sheet 2

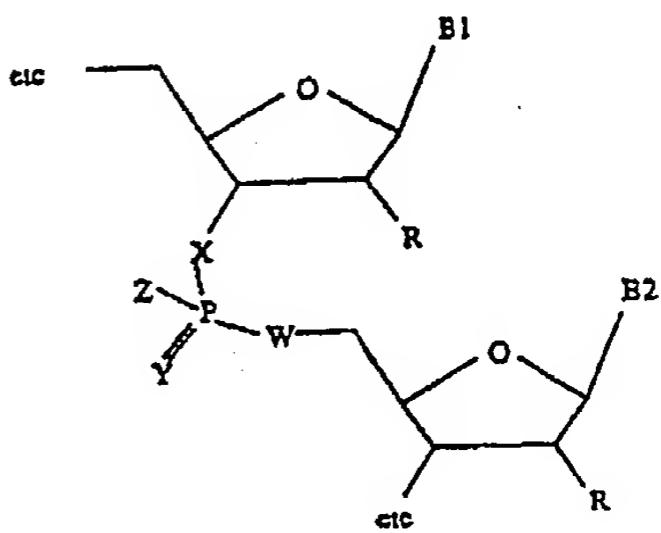
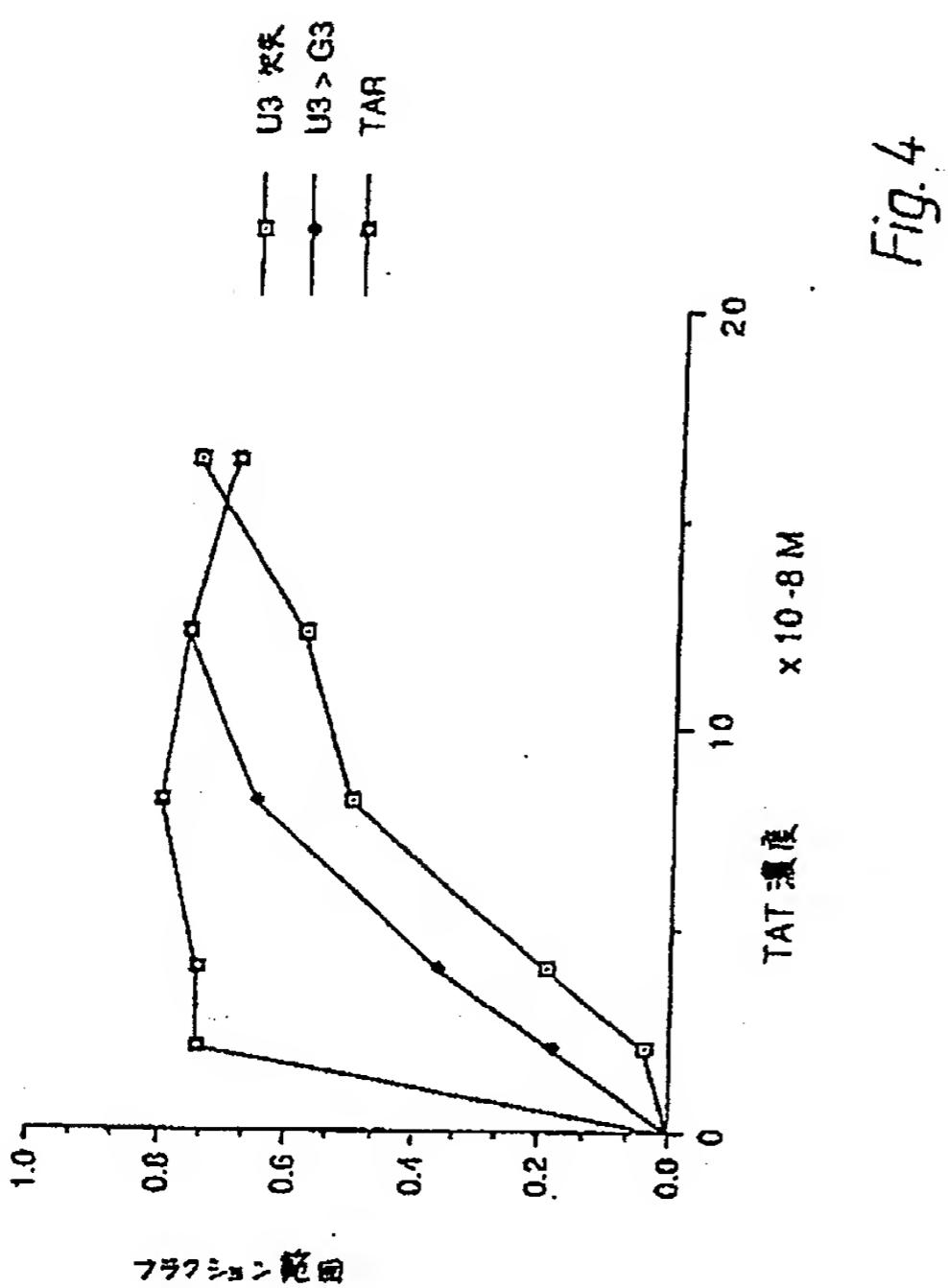


Fig. 5

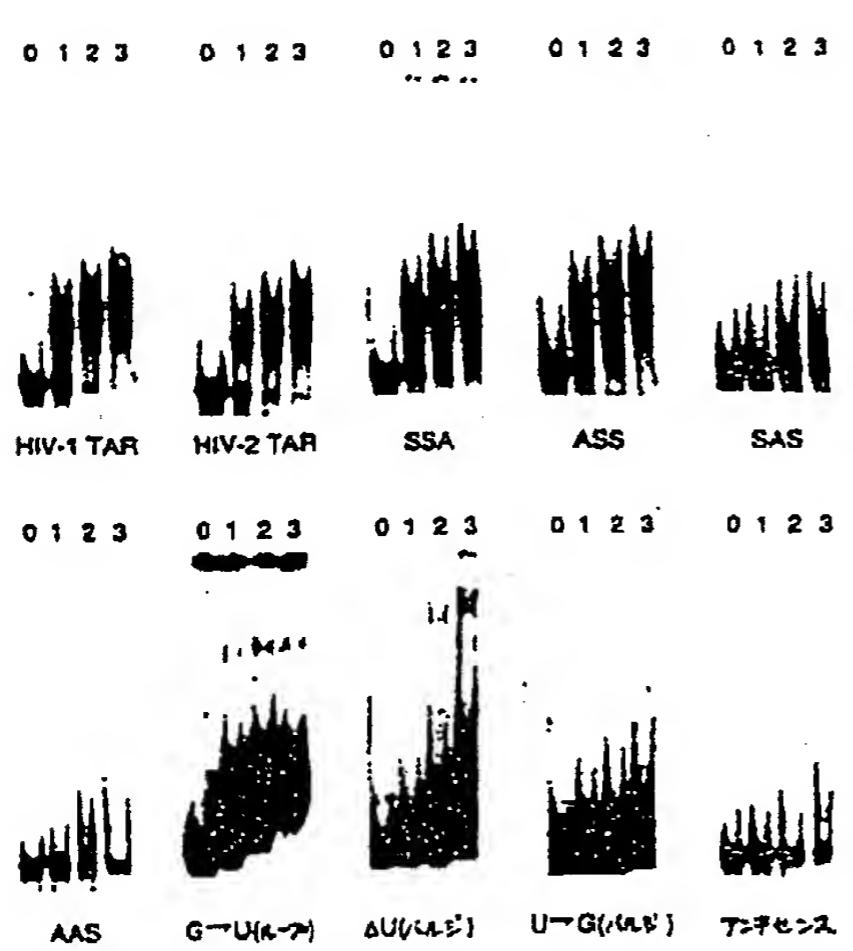
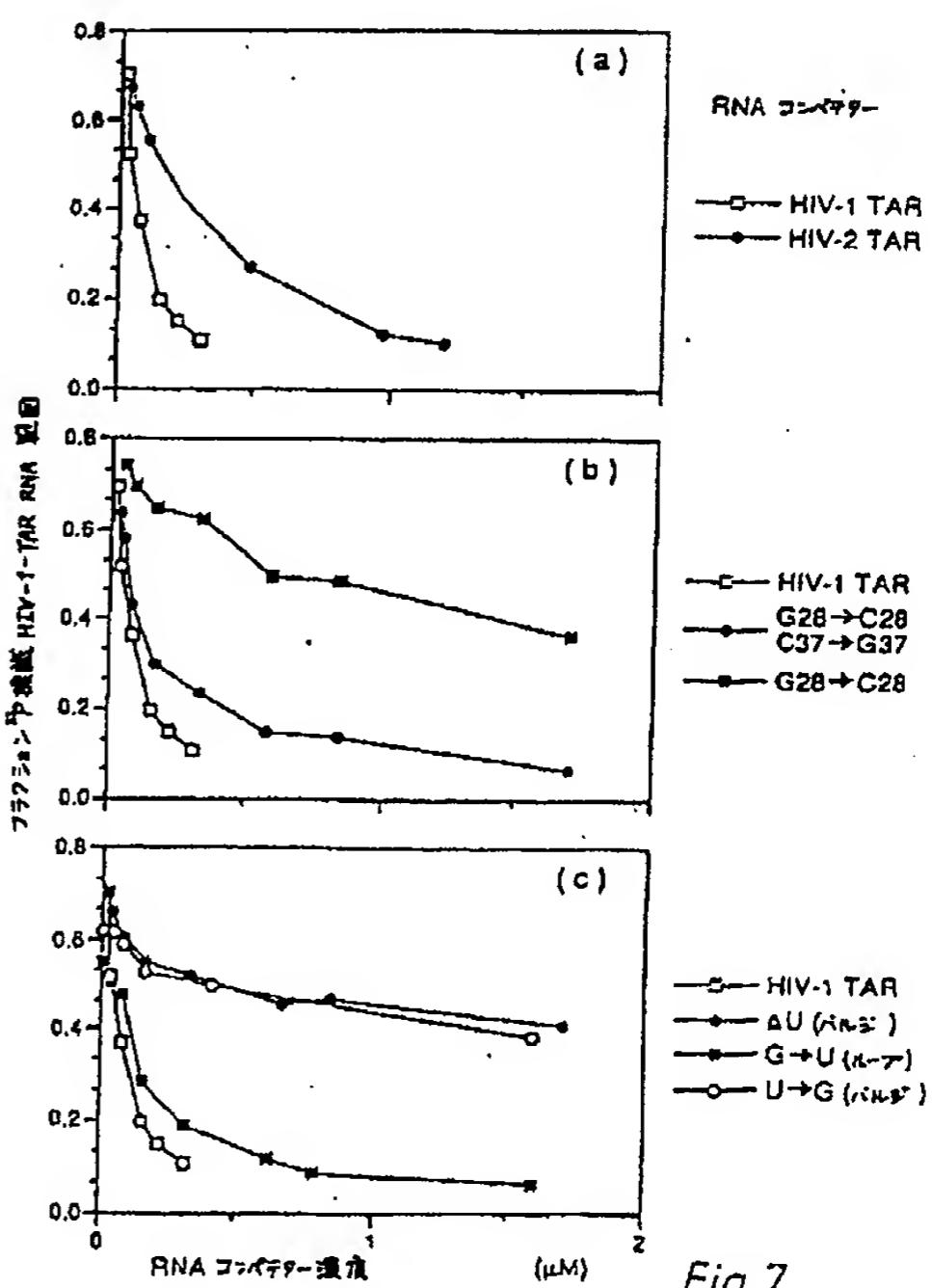


Fig. 6



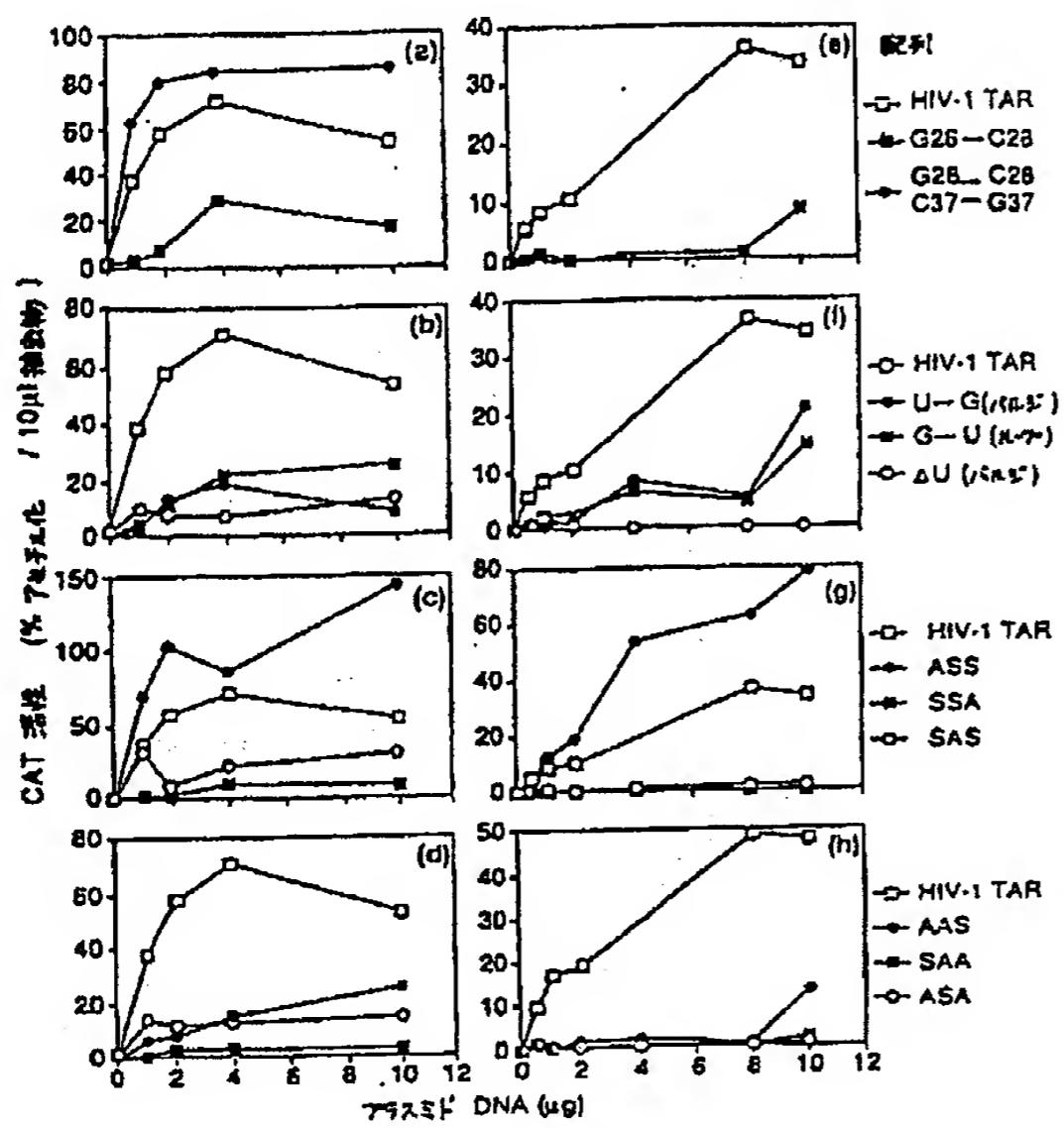


Fig. 8

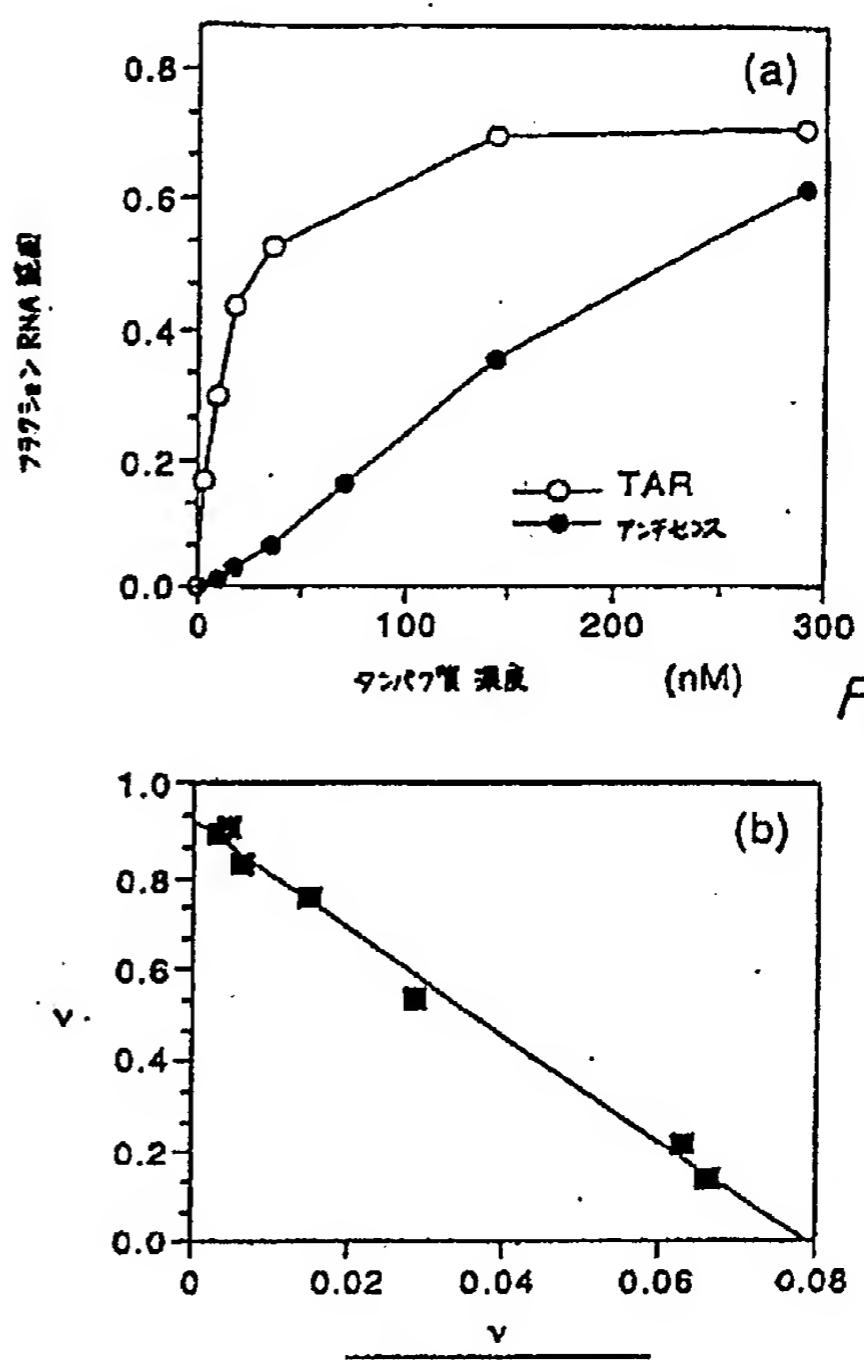


Fig. 9a

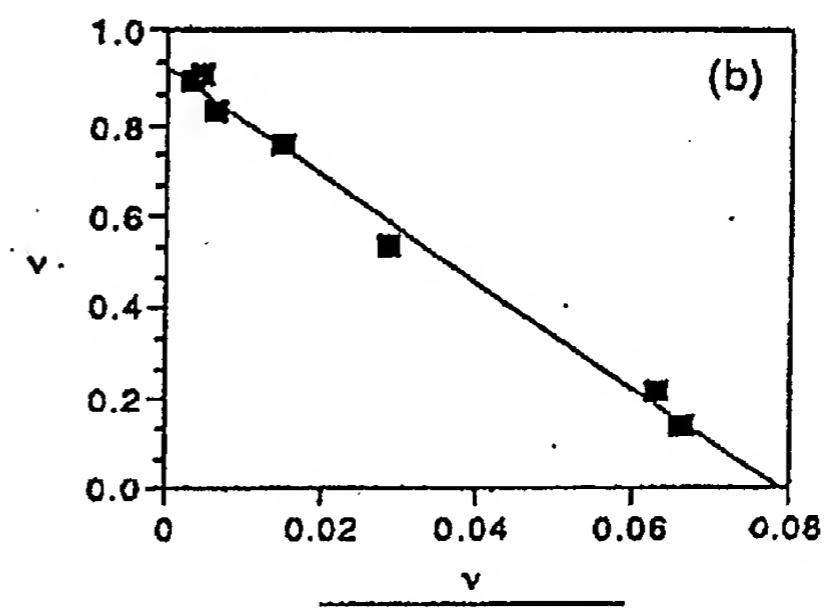


Fig. 9b

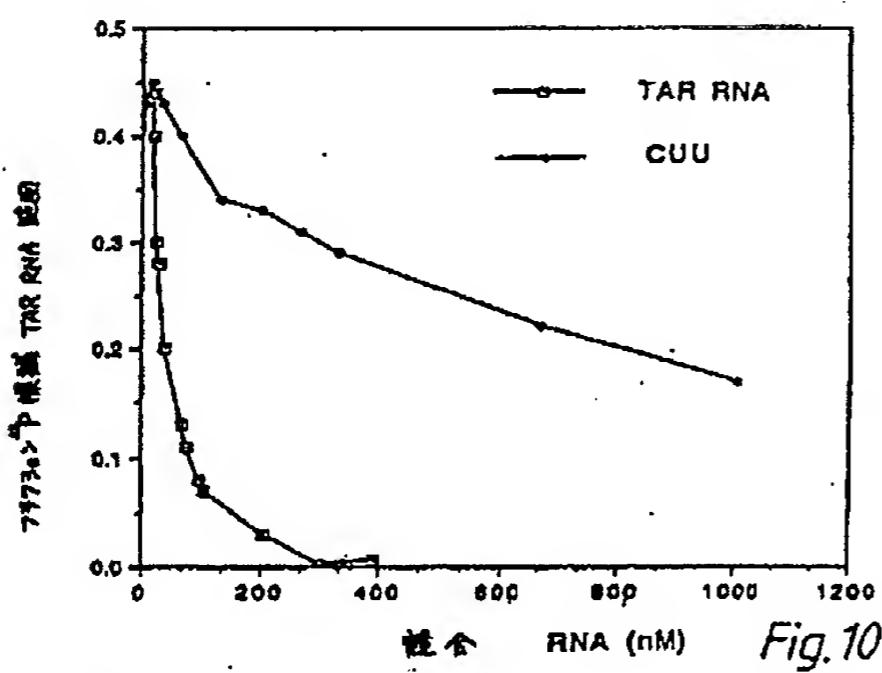


Fig. 10

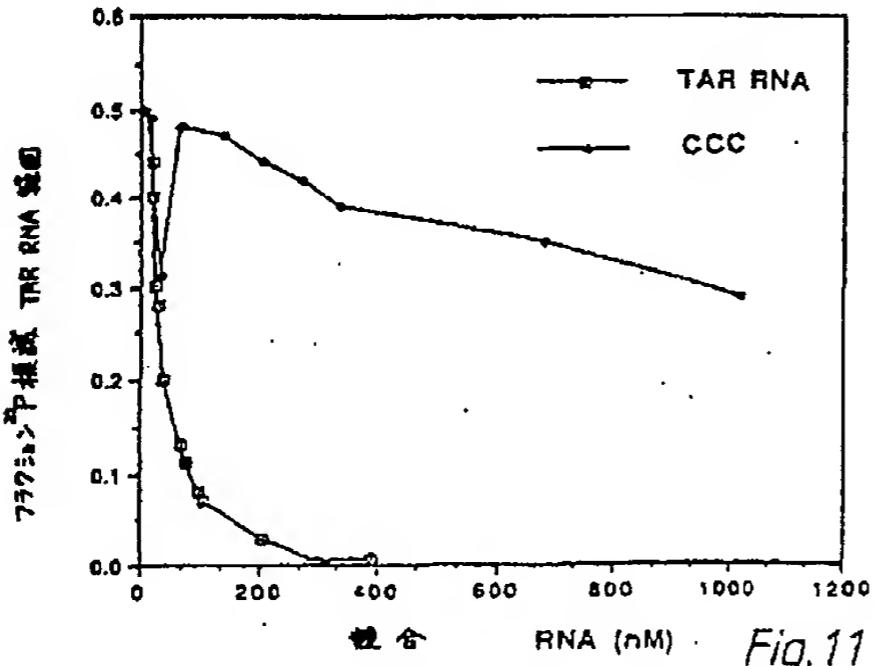


Fig. 11

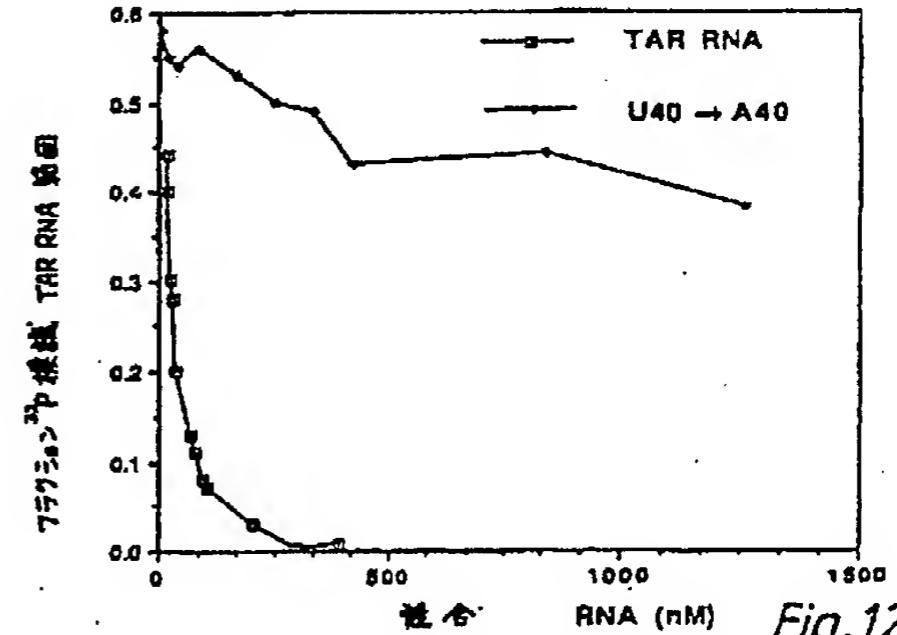


Fig. 12

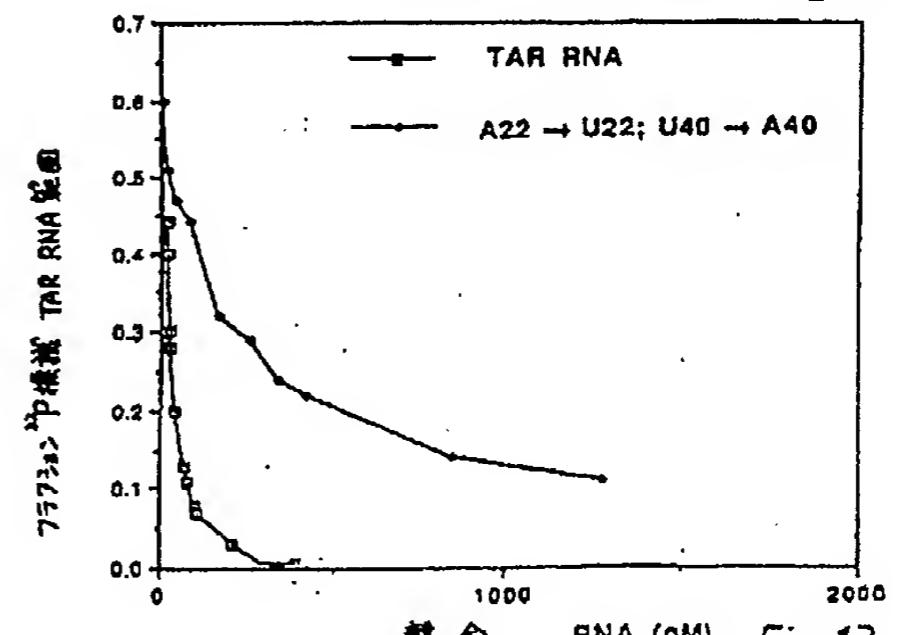


Fig. 13

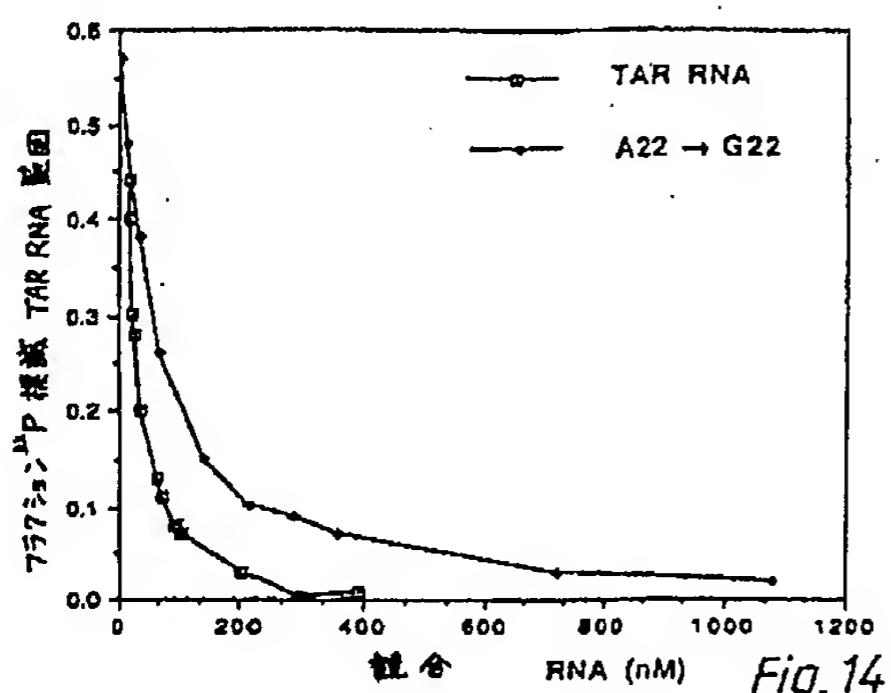


Fig. 14

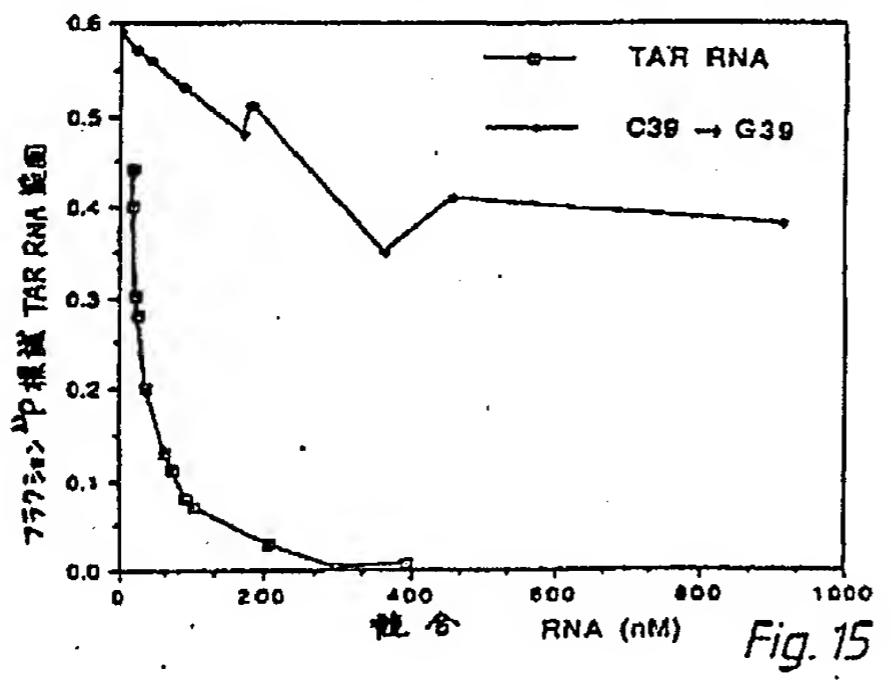


Fig. 15

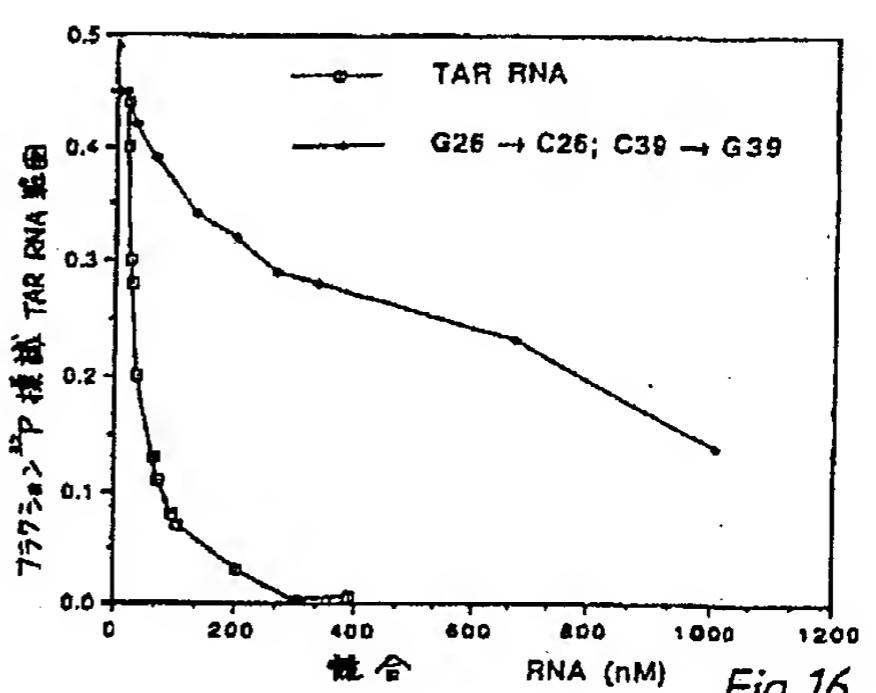


Fig. 16

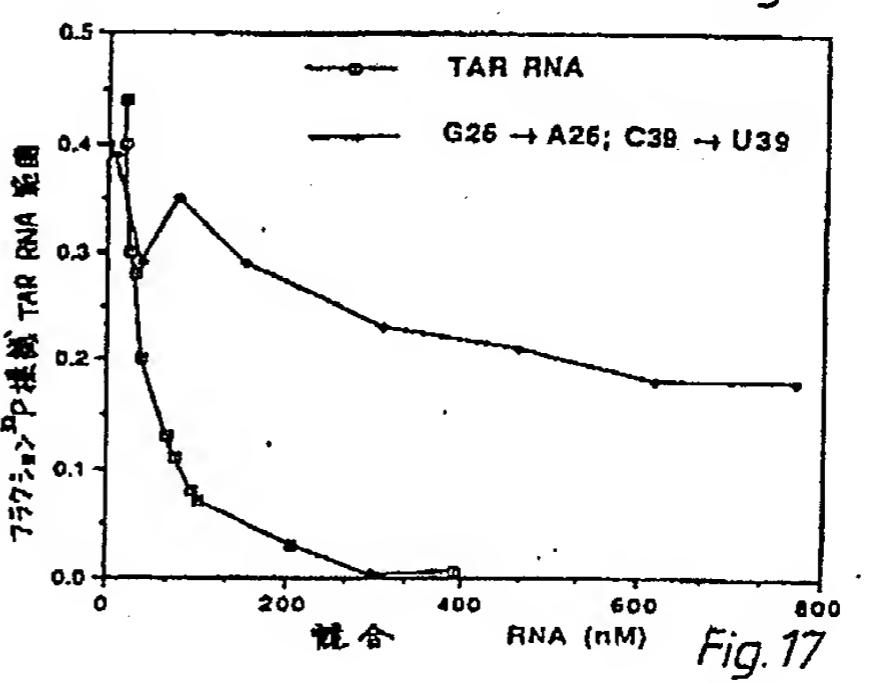


Fig. 17

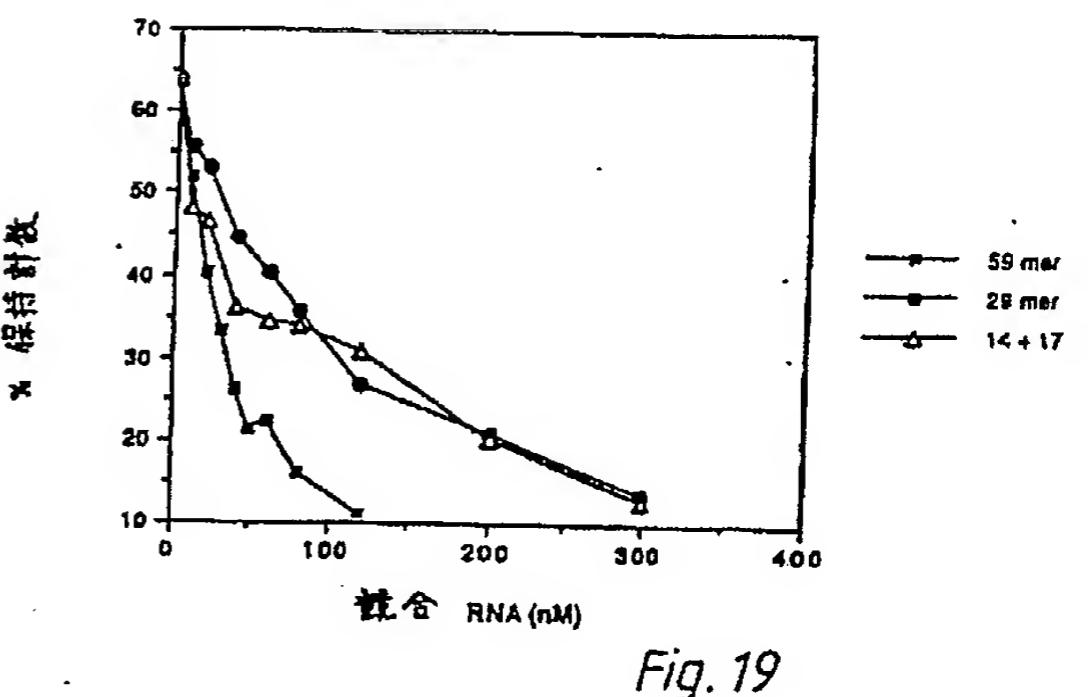
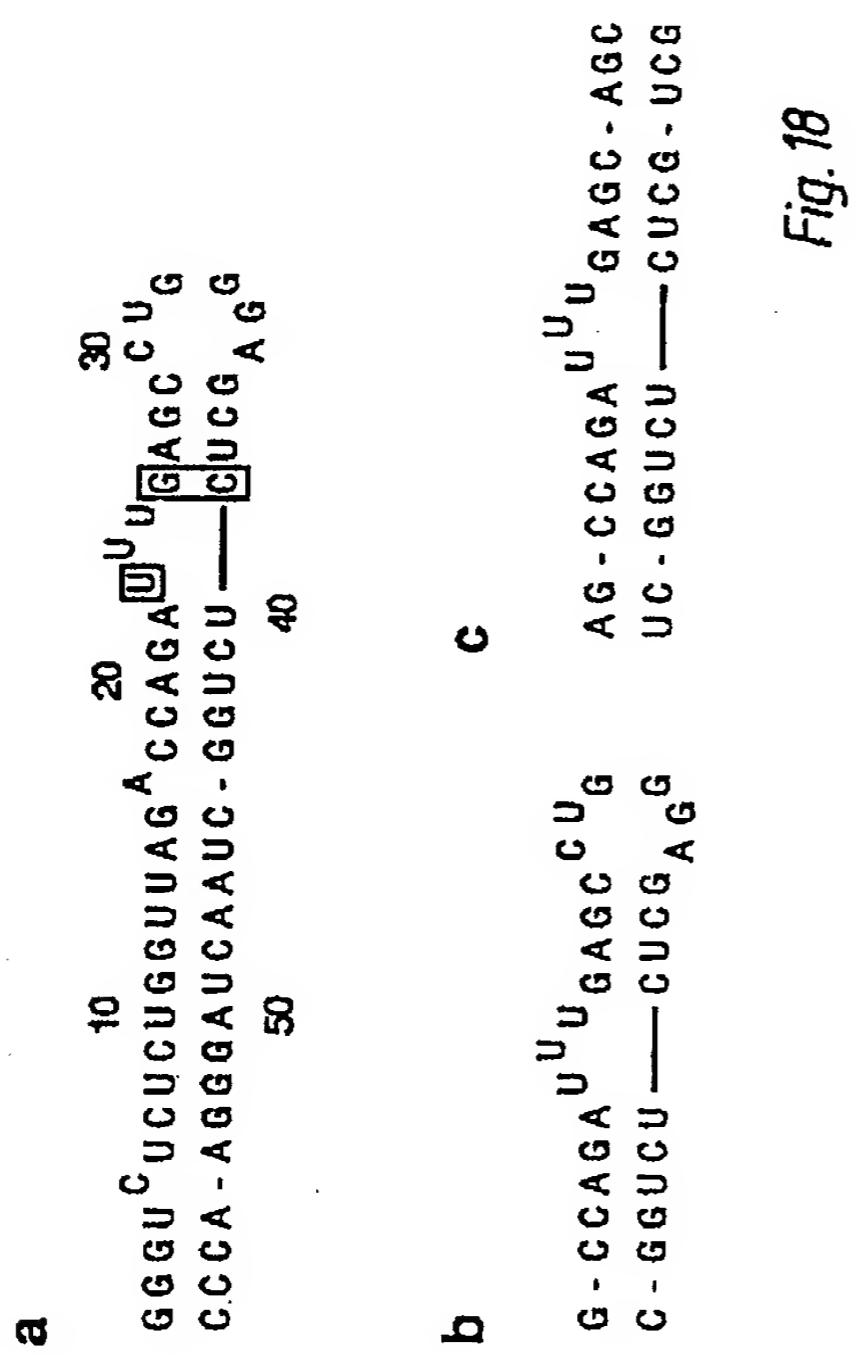


Fig. 19

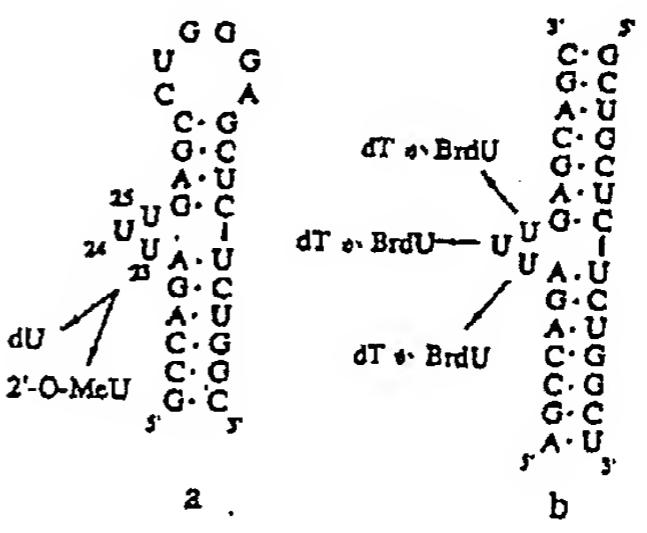


Fig. 20

特表平6-500012(29)

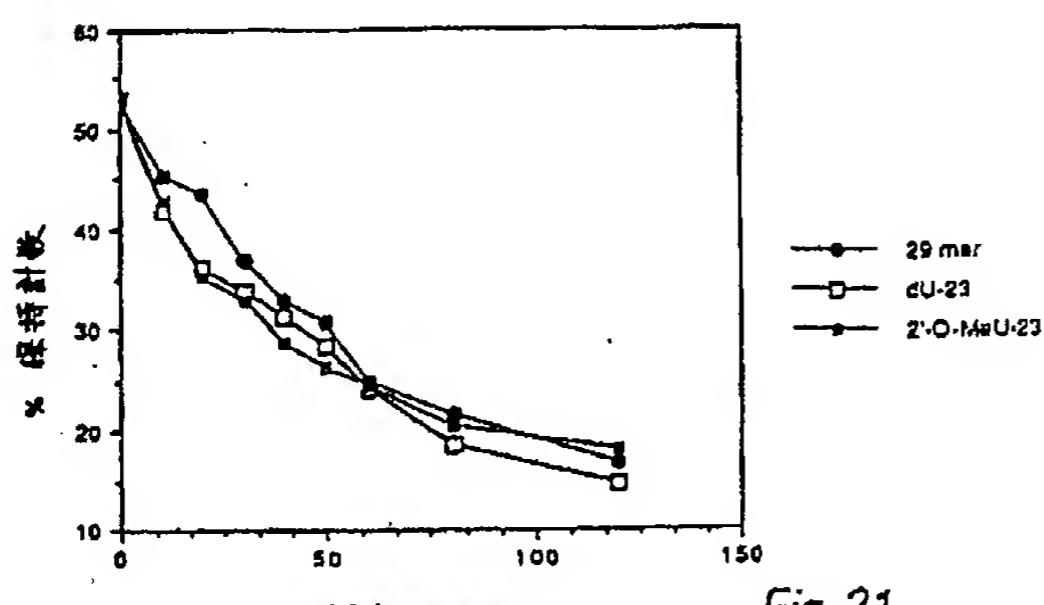


Fig. 21

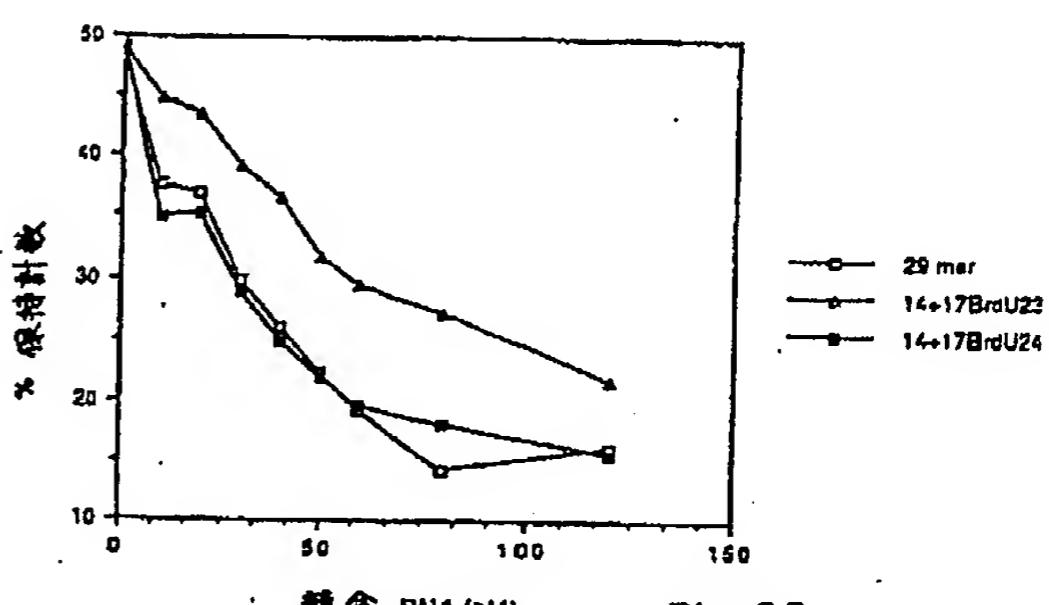


Fig. 23

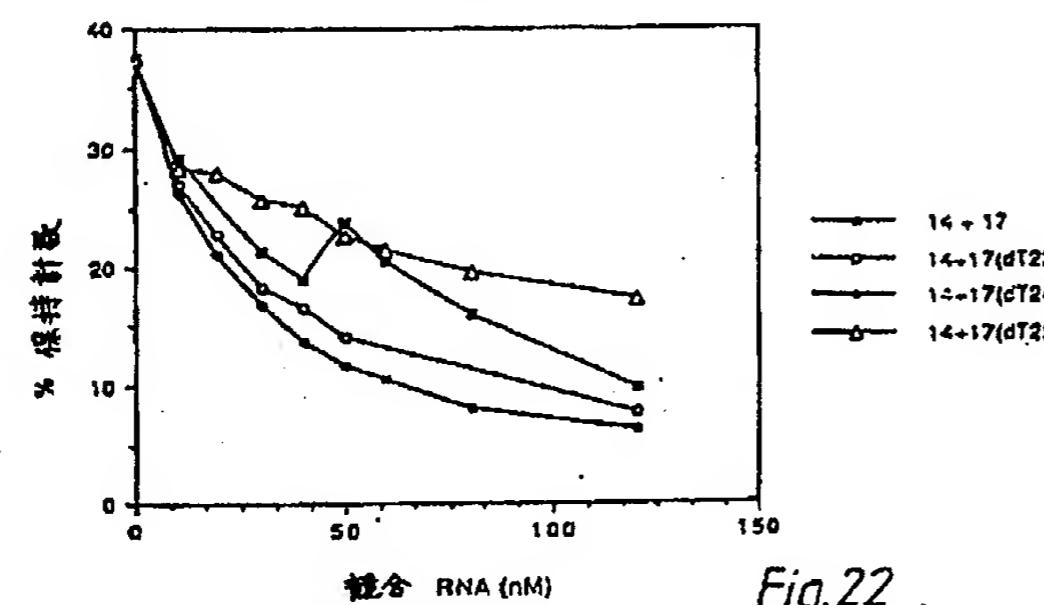


Fig. 22

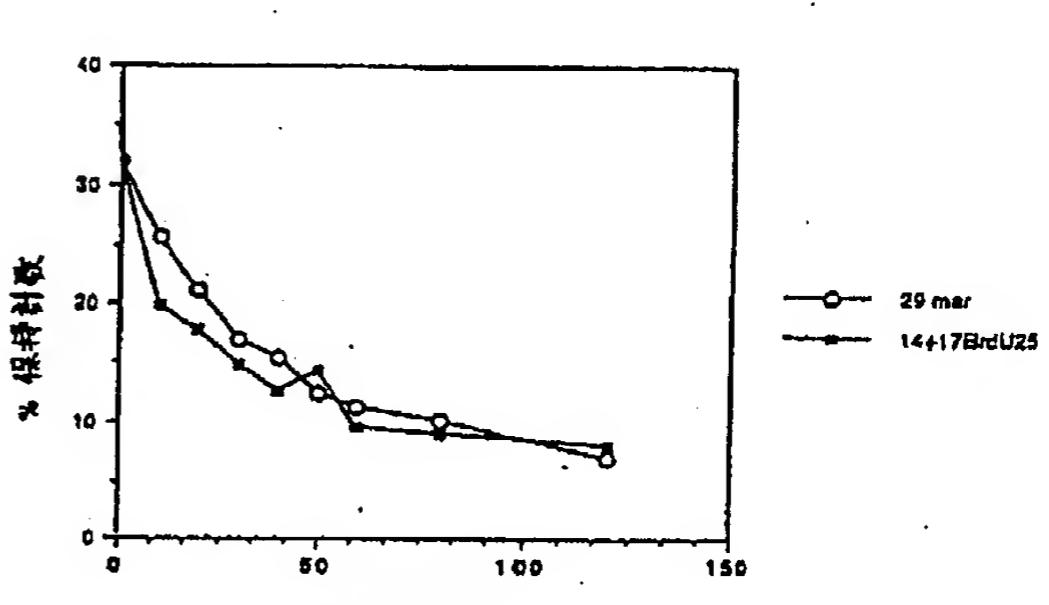


Fig. 24

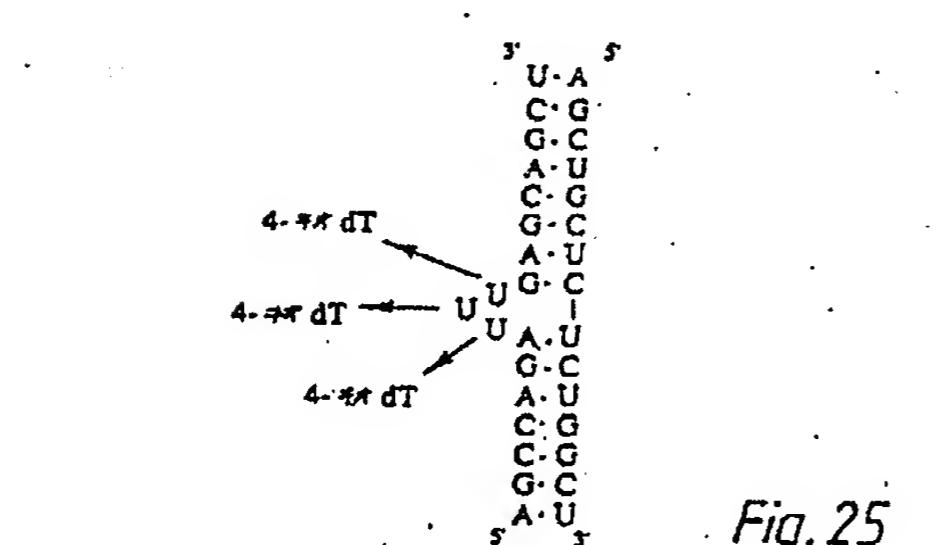


Fig. 25

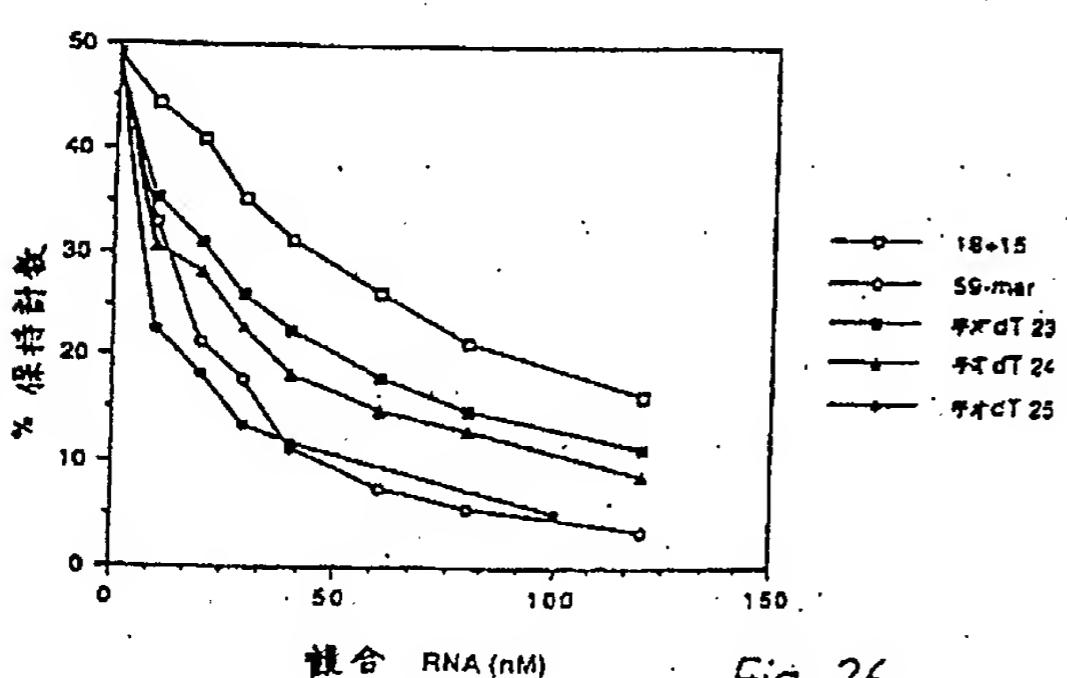


Fig. 26

補正書の写し(説明文)提出書(特許法第184条の8)

平成5年2月2日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

国際出願番号: PCT/GB91/01321

2. 発明の名称

ウィルス(HIV)増殖抑制

3. 特許出願人

住所 イギリス、ダブリュ・1・エヌ 4・エイ・エル、ロンドン、
パーク・クレッセント、20

名称 メディカル・リサーチ・カウンシル

代表者 ウッド、エム

国籍 イギリス

4. 代理人

住所 大阪市北区南森町2丁目1番29号 住友銀行南森町ビル
電話 大阪(06)361-2021

氏名 弁理士(6474)深見久郎



5. 補正書の提出年月日

1992年5月8日

6. 添付書類の目録

補正書の写し(説明文)

1通



特表平6-500012 (30)

1に従った分子または請求項3に従った薬学的組成物を患者に投与するステップを含む、方法。

7. TAR RNAへのtatプロテインの結合を抑制する化合物を同定するための検定であって、化合物をtatプロテインおよび請求項1に従った分子と反応させることと、その分子へのtatの結合度を測定することを含む、検定。

8. 合成分子は長さにおいて20個の残基より長くないオリゴヌクレオチドからなる、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

9. オリゴヌクレオチドは、HIV TAR RNAの配列におけるU_{2,3}に対応するウリジン残基を含む3つの不对残基を含むと共に、HIV TAR RNA配列におけるG_{2,8}-G_{3,9}に対応するフランキング塩基対を含む、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

10. RNA結合配列はDNA配列に組込まれる、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

11. その、または各オリゴヌクレオチドは、天然に存在するオリゴヌクレオチドであるか、修饰された塩基および／もしくは糖ならびに／または結合を有するオリゴヌクレオチドのような構造的に関連した変形物である、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

12. その、または各オリゴヌクレオチドは1つ、またはそれより多い4-チオ-2'-デオキシチミジン残基の

International Application No. PCT/GB 91/01321		
I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classifications apply, indicate all) According to International Patent Classification (IPC) or in each National Classification and IPC IPC5: A 61 K 31/70, G 01 H 33/52, C 12 Q 1/70, G 01 H 33/669		
II. FIELDS SEARCHED <i>(Indicate by checkmark which classification schemes were used)</i> Classification System Classification Schemes IPC5 A 61 K		
Information disclosed under Rule 13(3)(b) of the Convention or the first three dimensions are indicated in PCT/GB 91/01321		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <i>(Continued from the second sheet)</i>		
Category	Claim or Document, with indication, where appropriate, of the relevant page(s) or part(s) referred to in the claims	Relevant to Claim No.
P,X	EP, AI, 0386563 (BAYER AG) 12 September 1990, see the whole document.	1-6,8- 12
P,X	SCIENCE, vol. 249, 1990, Hiroaki Mitsuya et al; "Molecular Targets for AIDS Therapy", see page 1533 - page 1544 especially page 1536, column 2	1-6,8- 12
P,X	PROC.NATL.ACAD.SCI., vol. 87, 1990, Geoffrey J. Graham et al; "RNA transcripts of the human immunodeficiency virus transactivation response element can inhibit action of the viral transactivator", see page 5817 - page 5821 especially page 5821	1-6,8- 12
<small>* Special categories of cited documents: "A" prior art document published more than one year prior to the filing date of the application for which the International Search Report was prepared. "B" prior art document not published or not cited in the International Search Report. "C" document which may prove relevant to the patentability of the claimed invention on the basis of evidence of its disclosure in combination with other documents. "D" document relating to an oral disclosure, i.e., a finding of fact. "E" document published later than the International filing date but earlier than the priority date of the application. "F" document neither of the above systems.</small>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Filing of the International Search Report	
4th November 1991	22 JAN 1992	
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer <i>[Signature]</i>	

International Application No. PCT/GB 91/01321		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Claim or Document, with indication, where appropriate, of the relevant page(s) or part(s) referred to in the claims	Relevant to Claim No.
P,X	CELL, vol. 63, 1990, Bruce A. Sullenger et al; "Overexpression of TAR Sequences Renders Cells Resistant to Human Immunodeficiency Virus Replication", see page 601 - page 606 especially page 605 - page 606 (Discussion)	1-6,8- 12
A	CELL, vol. 63, 1990, Robert A. Marciniak et al; "HIV-1 Tat Protein Trans-Activates Transcription In Vitro", see page 791 - page 802	1-6,8- 12
A	GENES & DEVELOPMENT, vol. 3, 1989, Mark J. Selby et al; "Structure, sequence, and position of the stem-loop in tar determine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat", see page 547 - page 558	1-6,8- 12
A	NATURE, vol. 334, 1988, Sandy Feng & Eric C. Holland; "HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar", see page 165 - page 167	1-12

International Application No. PCT/GB 91/01321		
FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET		
V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE		
<small>This International Search Report has been completed in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:</small>		
<input checked="" type="checkbox"/> <small>Claim requires, e.g., methods which may not be subject matter required to be reported by the International Searching Authority, namely See PCT Rule 39.3(iv) Methods for treatment of human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.</small>		
<input checked="" type="checkbox"/> <small>Claim contains, however they relate to parts of the international application that do not comply with the provisions of the International Search Report, it would be expected that the corresponding International Patent Office will be advised of such non-compliance.</small>		
<input checked="" type="checkbox"/> <small>Claim purports to claim, however they are dependent of prior art and are not directed to inventions with the same and their equivalents.</small>		
VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING		
<small>This International Searching Authority found multiple inventions in this International application as follows:</small>		
<small>see next page.</small>		
<input checked="" type="checkbox"/> <small>As an additional search fees were freely paid by the applicant, this International Search Report covers all inventions of the International application.</small>		
<input checked="" type="checkbox"/> <small>As only some of the (and not additional) search fees were freely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims of the International application for which fees were paid, subsequently charged.</small>		
<input checked="" type="checkbox"/> <small>As no additional search fees were freely paid by the applicant, Consequently, this International Search Report covers all inventions of the International application.</small>		
<small>I-6,8-12</small>		
<input checked="" type="checkbox"/> <small>As an additional search should be effected without effect specifying an additional fee, the International Searching Authority requests payment of the additional search fees.</small>		
<small>Request for payment:</small>		
<input checked="" type="checkbox"/> <small>The additional search fees were compensated by applicant's original.</small>		
<input type="checkbox"/> <small>No request accompanied the payment of additional search fees.</small>		

Form PCT/GB/91/01321 (continued from PCT/GB/91/01321)

特表平6-500012 (31)

International Application No. PCT/GB 91/01321

PATENT INFORMATION CONTINUED	
<p>1) Claims 1-6, 8-12. A synthetic molecule comprising at least one oligonucleotide comprising an RNA binding sequence corresponding to the site bound by the HIV protein tat and the use thereof in the manufacture of a medicament for inhibiting growth of HIV within cells.</p> <p>2) Claim 7. An assay for identifying compounds that inhibit binding of tat protein to TAR RNA.</p>	

PCT/GB91/01321

国際調査報告

PCT/GB 91/01321

SA 50120

This sheet lists the patent family members relating to the patent application cited in the above-referenced International Search Report.
The numbers are as assigned to the European Patent Office EPO file as
The European Patent Office is as far as possible for the purpose of information.

27/09/91

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family (country)	Publication date
EP-A1- 0386563	12/09/90	DE-A- 3907562 JP-A- 2276877	13/09/90 13/11/90

For more details about this document, contact the European Patent Office, No. 1300
BIRCHWOOD PARK

フロントページの続き

(51) Int.Cl. 5
// G 01 N 33/53

識別記号 庁内整理番号
D 8310-2J

F I

(72) 発明者 ヒーフィイ、シャウン
イギリス、シイ・ビイ・1 3・アール・
エス、ケンブリッジ、レイドガンド・ロー
ド、76

(72) 発明者 ディングウォール、コリン
イギリス、シイ・ビイ・1 4・エル・ワ
イ、ケンブリッジ、チェリー・ヒントン、
コンウェイ・クロース、5

特表平6-500012

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成11年(1999)3月23日

【公表番号】特表平6-500012

【公表日】平成6年(1994)1月6日

【年通号数】

【出願番号】特願平3-513229

【国際特許分類第6版】

C12N 15/09 ZNA

A61K 31/70 ADY

48/00 ABD

C12Q 1/68

G01N 33/15

33/566

【F I】

C12N 15/00 ZNA A

A61K 31/70 ADY

48/00 ABD

C12Q 1/68 Z

G01N 33/15 Z

33/566

手 続 補 正 書

平成10年 7月29日

特許庁長官印

1. 事件の表示

平成03年特許第513229号



6. 補正対象品類名

請求の範囲

7. 補正対象項目名

請求の範囲

8. 補正の内容

請求の範囲を別紙のとおり補正する。

以上:

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ワイガーターグッ・ホールディングス・パブリック・リミテッド・カンパニー

3. 代理人

住所 〒550-0054
大阪市北区南森町2丁目1番28号
住友銀行南森町ビル
電 06-361-2021 (内)
FAX 06-361-1731 (G M - G II)

氏名 井理士 (6474) 深尾 久郎



4. 補正命令の日付

貞光(出願審査請求と同可)

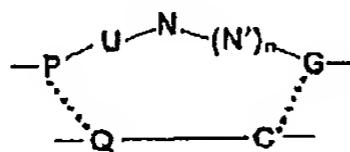
5. 補正により増加する請求項の数

2

特表平6-500012

請求の範囲

- 2つまたは3つの不对残基を含み、前記2つまたは3つの不对残基の3'側および5'側の両端には少なくとも1つの残基が隣接しており、前記隣接する残基の一方は他方とフランギング塩基対を形成しており、前記不对残基はHIV TAR RNA配列中のU_nに相当するウリジン残基を含み、前記フランギング塩基対の1つはHIV TAR RNA中のC_n: C_n塩基対に相当するG: C塩基対であり、ただし69残基以下の長さの一本鎖分子である、核酸分子。
- 2つの別個の鎖を含み、前記2つの鎖のうちの第1の鎖は2つまたは3つの不对残基を含み、前記2つまたは3つの不对残基の3'側および5'側の両端には少なくとも1つの残基が隣接しており、前記隣接する残基の一方は、前記2つの鎖のうちの第2の鎖にある他方の残基とフランギング塩基対を形成しており、前記不对残基はHIV TAR RNA配列中のU_nに相当するウリジン残基を含み、かつ前記フランギング塩基対の1つはHIV TAR RNA中のG_n: C_n塩基対に相当するG: C塩基対である、核酸分子。
- HIV t_{at}タンパク質のTAR結合部位に対して、HIV TARと結合する核酸分子であって、



の構造を含み、ここで、

n は0または1であり、
 N は任意のヌクレオチドであり、かつ
 n' は任意のヌクレオチドであり、かつ

- HIV t_{at}タンパク質のTAR結合部位に対して、HIV TARと結合する核酸分子であって、核酸配列

$5' - \text{P} - \text{U} - \text{N} - (\text{N}')_{\text{n}} - \text{G} - 3'$ と $3' - \text{Q} - \text{C} - 5'$

のアミーリングにより形成され、ここで、

n は0または1であり、
 N は任意のヌクレオチドであり、
 n' は任意のヌクレオチドであり、かつ

P と Q は塩基対を形成するヌクレオチドである、核酸分子。

5. Pはアデニンであり、かつQはウリジンである、請求項4または請求項4に記載の核酸分子。

6. n は3であり、Nはウリジンまたはシトシンであり、かつ n' はウリジンである、請求項3から5のいずれか1項に記載の核酸分子。

7. $\text{P}-\text{U}-\text{N}- (\text{N}')_{\text{n}}-\text{G}$ -配列および $\text{Q}-\text{C}$ -配列が、別個の核酸鎖中に存在する、請求項3から6のいずれか1項に記載の核酸分子。

8. $\text{P}-\text{U}-\text{N}- (\text{N}')_{\text{n}}-\text{G}$ -配列および $\text{Q}-\text{C}$ -配列が、一本の核酸鎖中に存在する、請求項3から6のいずれか1項に記載の核酸分子。

9. 修飾された塩基および/または結合および/または結合を含む、請求項1から8のいずれか1項に記載の核酸分子。

10. インビザでの干渉が増加するよう変更されている、請求項1から8のいずれか1項に記載の核酸分子。

11. 請求項1から10のいずれか1項に記載の核酸分子を含む空薬剤成物。

12. ヒトタンパク質のTAR RNAへの結合を阻害する化合物を同定するためのアッセイ法であって、(a) 請求項1から10のいずれか1項に記載の核酸分子とともにヒトタンパク質をインキュベートする工程と、(b) 前記核酸分子にお合されるヒトタンパク質の量を測定する工程とを含み、其際に化合物の存在下での前記TAR RNAへのヒトタンパク質の結合が前記化合物の不存在での結合に対して減少することが阻害を示すものである、アッセイ法。

13. 阻害として作用するための請求項1から10のいずれか1項に記載の核酸分子。

14. HIVの複製を阻害するための医薬の製造における請求項1から10のいずれか1項に記載の核酸分子の使用。